

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

Mecanismos moleculares involucrados en la regionalización naso-temporal de la vesícula óptica en pez cebra.



María Hernández Bejarano

Madrid, 2018

Departamento de Biología Molecular

Facultad de Ciencias

Universidad Autónoma de Madrid

**Mecanismos moleculares involucrados en la regionalización
naso-temporal de la vesícula óptica en pez cebra.**

Memoria presentada por:

María Hernández Bejarano

Licenciada en Bioquímica

para optar al grado de Doctora en Biociencias Moleculares

Dirigido por:

Dra. Florencia Cavodeassi Madarro

y

Dra. Paola Bovolenta Nicolao

Tutora:

Beatriz Cubelos Álvarez

Esta tesis ha sido realizada en el Centro de Biología Molecular
“Severo Ochoa” (CSIC-UAM).

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha sido financiada a través de un proyecto de la Comisión Europea (CIG321788) de la Dra. Florencia Cavodeassi, y de varios proyectos del Ministerio de Economía y Competitividad concedidos a la Dra. Florencia Cavodeassi (BFU2014-55918-P y BFU2011-24701) y a la Dra. Paola Bovolenta Nicolao (BFU2013-43213-P).

RESUMEN

La capacidad para procesar y representar la información visual está determinada por la comunicación precisa entre la retina y los centros visuales primarios en el cerebro. En pez cebra, el principal centro de procesamiento visual es el tectum. La comunicación entre la retina y el tectum está mediada por las células ganglionares de la retina (CGR) que proyectan sus axones generando el mapa de inervación retinotectal. La topología de estas inervaciones depende del patrón axial de la retina durante el desarrollo embrionario, que proporciona información posicional a las CGR. Los primeros eventos de regionalización axial en la retina del pez cebra se producen antes de la evaginación de las vesículas ópticas con el establecimiento del eje naso-temporal (NT). Los factores de transcripción *Foxg1* y *Foxd1* (*forkhead box G/D1*) son los primeros determinantes conocidos de identidad NT, expresándose en dominios complementarios del primordio de ojo, *Foxg1* en la mitad dorsal (futuro dominio nasal) y *Foxd1* en la mitad ventral (futuro dominio temporal).

Los factores de crecimiento fibroblásticos (Fgfs) *Fgf3*, *Fgf8* y *Fgf24*, expresados en el prosencéfalo dorsal, confieren identidad nasal promoviendo la expresión de *foxg1* en la mitad dorsal de la vesícula óptica. La falta de función de *Fgf* conduce a la ausencia de *Foxg1*; sin embargo la expresión ectópica de los Fgfs en la mitad ventral de las vesículas ópticas no conlleva una completa expansión de *Foxg1*. Esto sugiere que otros mecanismos moleculares actúan en paralelo a los Fgfs en la formación del patrón NT de la retina.

En esta tesis exploramos la hipótesis de que Sonic Hedgehog (Shh) controle el establecimiento de identidad temporal en el primordio de ojo. Shh, producido por las células de la línea media ventral, está involucrado en el establecimiento de identidades ventrales durante el desarrollo del sistema nervioso central. En la región más anterior se expresa adyacente a la mitad ventral del primordio de ojo, futuro dominio temporal. Nuestros estudios de falta y ganancia de función revelan que Shh confiere identidad temporal, promoviendo la expresión de *foxd1*. Sin embargo, la eliminación simultánea de la actividad de *Fgf* y Shh conlleva la expresión de *foxd1* en la totalidad del primordio de ojo y resulta en un primordio completamente temporalizado. Este fenotipo sugiere que Shh es dispensable en ausencia de la actividad de *Fgf*, y que otros factores actúan en paralelo a Shh en la inducción de *foxd1*. Nuestras observaciones indican que *Rx3*, factor de transcripción expresado desde el comienzo de la especificación del primordio de ojo en este territorio, promueve la expresión de *foxd1* de manera autónoma celular, actuando conjuntamente con Shh en la inducción de identidad temporal.

En base a nuestras observaciones proponemos un modelo según el cual la actividad conjunta de Fgfs, Shh y *Rx3* promueve la subdivisión NT de la retina mediante el control de la

expresión de *foxd1* y *foxd1*. Una vez establecidos los dominios de expresión de *foxd1* y *foxd1*, éstos se mantienen por represión mutua, promoviendo el refinamiento y mantenimiento de la subdivisión NT.

Por último, para comprender la relevancia que el establecimiento de la subdivisión NT pueda tener para una correcta función visual, llevamos a cabo un test de respuesta optocinética en larvas carentes de dominio nasal o temporal en la retina. La respuesta optocinética es un estímulo involuntario en respuesta a los estímulos visuales que se correlaciona con la agudeza visual. Los datos obtenidos de nuestro análisis indican que, mientras que la pérdida de identidad nasal no compromete la agudeza visual, la presencia del dominio temporal parece ser esencial para la correcta función visual del embrión.

ABSTRACT

The ability to process and represent visual information is determined by accurate communication between the retina and the primary visual centers in the brain. In zebrafish, the main visual processing center is the tectum. The communication between the retina and the tectum is mediated by the retinal ganglion cells (RGC) that project their axons generating the retinotectal innervation map. The topology of these innervations depends on the axial patterning of the retina during embryonic development, which provides positional information to the RGCs. The first events of axial regionalization in the zebrafish retina take place prior to optic vesicle evagination with the establishment of the naso-temporal (NT) axis. The *Foxg1* and *Foxd1* (*forkhead box G/D1*) transcription factors are the first known determinants of NT identity, being expressed in complementary domains of the eye primordium - *Foxg1* in the dorsal half (future nasal domain) and *Foxd1* in the ventral half (future temporal domain)-. Fibroblast growth factors (Fgfs) *Fgf3*, *Fgf8* and *Fgf24*, expressed in the dorsal forebrain, confer nasal identity promoting *foxg1* expression in the dorsal half of the optic vesicle. Lack of Fgf function leads to the absence of *Foxg1*. However, ectopic expression of Fgfs in the ventral half of the optic vesicle does not result in a complete expansion of *Foxg1*. This suggests that other molecular mechanisms act in parallel to Fgfs to establish the NT pattern in the developing retina.

In this PhD we explored the hypothesis that Sonic Hedgehog (Shh) controls the establishment of temporal identity in the eye primordium. Shh, produced by the embryonic ventral midline cells, is involved in the establishment of ventral identities during central nervous system development. The source of Shh is located adjacent to the ventral half of the eye primordium, the future temporal domain. Experiments of loss and gain of function reveal that Shh confers temporal identity promoting *foxd1* expression. Loss of Shh activity results in abrogation of *foxd1* expression. However, simultaneous abrogation of Fgf and Shh activity leads to *foxd1* expression in the whole eye primordium and results in a fully temporalized primordium. This phenotype suggests that Shh is dispensable in the absence of Fgf signalling, and that other factors act in parallel to Shh to induce *foxd1*. Our studies reveal that *Rx3*, a transcription factor expressed from the onset of eye field specification in this territory, promotes *foxd1* expression in the eye primordium in a cell-autonomous manner, acting together with Shh in the induction of temporal identity.

Based on our observations, we propose a model according to which the coordinated activity of Fgfs, Shh and *Rx3* promotes the subdivision of the retina in nasal and temporal domains by controlling *foxg1* and *foxd1* expression. Once established, the domains of *foxg1* and *foxd1* are maintained by mutual repression, promoting the refinement and maintenance of the NT subdivision.

Finally, to assess the importance of the NT subdivision for visual function, we carried out an opto-kinetic response (OKR) test in larvae lacking the nasal or the temporal domain in the retina. The opto-kinetic response is an involuntary eye movement in response to visual stimuli that correlates with visual acuity. The data obtained from our analyses indicate that, while loss of nasal identity does not compromise visual acuity, the presence of the temporal domain seems to be essential for the correct visual function of the larva.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	21
INTRODUCCIÓN	27
Vía de señalización de Fgf	30
Vía de señalización de Hh	31
Vía de señalización de Nodal	32
Especificación y regionalización de la placa neural anterior	34
- Segregación del campo de ojo de los territorios neurales adyacentes	35
Morfogénesis del campo de ojo	36
- Evaginación de las vesículas ópticas:	36
- Plegamiento de las copas ópticas:	37
Especificación de la vesícula óptica en retina neural, epitelio pigmentario de la retina y tallo óptico ..	38
Regionalización del eje naso-temporal	40
Diferenciación de la retina y formación del mapa retinotectal	41
OBJETIVOS.....	47
Líneas de peces y mantenimiento	53
Generación del alelo nulo <i>foxd1cbm16</i> utilizando la técnica CRISPR-Cas9	54
Genotipado.....	55
Clonaje de plásmidos para inyección	56
Microinyección de plásmidos.....	57
Microinyección de ARNm y trasplantes	57
Detección de ARN mensajero.....	57
Inmunofluorescencia	58
Tratamientos con inhibidores	59
Trazado de proyecciones retinotectales.....	59
Test de respuesta optocinética	59
Montaje de embriones y adquisición de imagen	61
Procesamiento de datos	61
- Análisis estadístico de la respuesta optocinética:.....	62
- Embriones analizados en cada experimento:	62

RESULTADOS.....	63
1. La inhibición de la señalización de Hh resulta en la pérdida de identidad temporal de las vesículas ópticas.	65
2. La actividad ectópica de Hh suprime identidad nasal e induce identidad temporal en las vesículas ópticas.	68
3. La señalización de Fgf no afecta a la actividad de Hh mientras que la señalización de Hh promueve la actividad de Fgf.....	70
4. La señalización de Fgf no es suficiente para promover identidad nasal en toda la retina	73
5. La eliminación simultánea de Fgf y Hh rescata parcialmente el patrón NT	74
6. Niveles altos de actividad de las vías de señalización de Fgf y Hh no alteran el patrón NT	76
7. La red regulatoria génica que establece el patrón NT de la retina actúa desde el inicio de la especificación del campo de ojo	78
8. La vía de señalización de Nodal no es determinante para la expresión de <i>foxd1</i> y la especificación temporal de la retina	79
9. Rx3 promueve la expresión de <i>foxd1</i> en el campo de ojo de manera autónoma celular	82
10. Rx3 no modula la actividad de la señalización de Fgf y Shh.	85
11. Shh y Rx3 cooperan para promover la expresión de <i>foxd1</i> en la porción ventral del primordio de ojo	86
12. La represión mutua entre <i>Foxg1</i> y <i>Foxd1</i> restringe y mantiene el borde entre los dominios nasal y temporal.....	89
13. La especificación del dominio temporal es esencial para una correcta función visual.	92
DISCUSIÓN.....	95
Rx3 participa en la regionalización del campo de ojo.....	98
Acoplamiento entre el establecimiento del eje NT y la morfogénesis del primordio de ojo	101
Las señales de Shh y Fgf actúan coordinadamente en la regionalización de múltiples sistemas	101
La regionalización NT de la retina especifica el mapa retinotectal	104
La subdivisión NT de la retina y la función visual	105
CONCLUSIONES.....	109
REFERENCIAS	113

ABREVIATURAS

A = Anterior
AKT = Ak thymoma
BMP = bone morphogenetic protein
BNA =Borde neural anterior
Boc = Brother of Cdon
Cas9 = CRISPR associated protein 9
Cdon = Cell adhesion molecule-related/down regulated by oncogenesis
CGR = Células ganglionares de la retina
CKI = Casein Kinase I
CRISPR STAT = CRISPR somatic tissue activity test
Cxcr4 = c-x-c chemoquine receptor 4
D = Dorsal
DAG = Diacilglicerol
Dhh = Desert hedhehog
DMSO = Dimetilsulfóxido
DO = Disco óptico
Ehh = Echidna hedgehog
EGF-CFC = Epidermal growth factor-CFC
Emx3 = Empty spiracles homeobox 3
EphA/B = Erythropoietin-producing human hepatocellular receptors A/B
EphrinA2/5 = Eph family receptor interacting proteins
Erm = Erythromycin Resistance Methylase
Ets = E26 transformation-specific
Fgf = Factor de crecimiento fibroblástico
FGFR = Fibroblast growth factor receptor
Foxg/d1 = Forkhead box G/D1
FoxH1 = Forkhead Box H1
FRS2 α =Fibroblast growth factor substrate 2 α
GAB1 = GRB2-associated-binding protein 1
Gas1 = Growth arrest-specific 1
GFP = Green fluorescent protein
Gli = Glioma-associated oncogene
GRB2 = Growth factor receptor-bound protein 2
GSK3 β = Glycogen synthase kinase 3

Hh = Hedgehog
 Hip = Hipotálamo
 HS =heparán sulfato
 Ihh = Indian hedgehog
 L = Lateral
 Lhx2 = LIM homeobox 2
 LRP6 = Low-density lipoprotein receptor-related protein 6
 M = Medial
 Mab21/2 =
 MAPK = Mitogen-Activated protein kinases
 Mitf = Melanogenesis associated transcription factor
 Mixer = Mix-like endodermal regulator
 mTOR = mammalian target of rapamycin
 N = Nasal
 Nlcam = Neurolin-like cell adhesion molecule
 Oep = One-eyed pinhead
 Otx2 = Orthodenticle homeobox 2
 P = Posterior
 Pard6 = Partitioning defective 6 homolog
 Pax2/6 = Paired box 2/6
 Pea3 = Polyoma enhancer activator 3
 PI3 = Phosphorus triiodide
 PI3K = Phosphoinositide 3-kinase
 PIP2 = Phosphatidylinositol 4,5 biphospato
 PKA = Protein kinase A
 PLCγ = Phopholipase C γ
 Ptch = patched
 Qhh = Qiqihar hedgehog
 QO = Quiasma óptico
 RAS = Rat sarcoma
 Robo = Roundabout
 ROC = Respuesta opto-cinética
 Rtk2 = Receptor protein-tyrosine kinase 2
 Rx3 = Retinal homeobox gene 3

Sema5A = Semaforina 5A
Shh = Sonic Hedgehog
Six3/6 = Sineoculis homeobox homolog 3/6
Smad = Small mothers against decapentaplegic
Smo = Smoothened
SOH_o1 = Sensory organ homeobox 1
SOS = Son of Sevenless
Spry = Sprouty
STAT = Signal transducer and activator of transcription
Sufu = Suppressor of fused
T = Temporal
Tbx = T-boxes
Tel = Telencéfalo
TGF β = Transforming growth factor β
Thh = Tiggywinkle hedgehog
Tlc = TRAM/LAG1/CLN8
Unc = Uncoordinated
V = Ventral
Vax1/2 = Ventral anterior homeobox 1/2
Vsx2 = Visual system homeobox 2

INTRODUCCIÓN

El desarrollo embrionario se caracteriza por la regulación precisa de la proliferación, migración y diferenciación celular tanto espacial como temporalmente. Estos procesos están controlados genéticamente, y dependen de la actividad coordinada de un número discreto de vías de señalización que orquestan las interacciones celulares conducentes a la formación de tejidos. Muchos de esos mecanismos moleculares tienen relevancia también en el organismo adulto, estando implicados en la homeostasis y la regeneración de sus tejidos y órganos.

Sorprendentemente, la variedad de procesos celulares involucrados en el desarrollo de un organismo es controlada por un número muy limitado de vías de señalización, las cuales presentan una alta conservación a nivel evolutivo entre especies. La acción de estas vías de señalización y las consecuencias de su actividad son altamente dependientes de contexto, dando lugar a distintas respuestas celulares en diferentes momentos del desarrollo y regiones del embrión. Así por ejemplo, durante el desarrollo embrionario de vertebrados la vía de señalización de Sonic-Hedgehog (Shh) está involucrada en procesos tan diversos como el establecimiento de identidades ventrales en el sistema nervioso central, la determinación del eje próximo-distal (PD) del primordio del ojo, o el control de la polaridad antero-posterior (AP) del primordio de los apéndices, entre otras muchas funciones (Egger et al., 1995).

La capacidad de las células embrionarias para responder a distintas vías de señalización está mediada por la presencia de receptores específicos para los ligandos de dichas vías. La interacción ligando-receptor activa una cascada de eventos intracelulares que deriva en última instancia en la regulación de la actividad de un pequeño número de factores de transcripción, los cuales desencadenan programas de expresión génica que impulsan cambios celulares. En ocasiones, la transducción de la señal implica la regulación de la estructura del citoesqueleto, sin pasar por la regulación de la expresión génica. Las células receptoras a su vez pueden volverse inductoras, generando nuevas señales que actúan sobre las células vecinas, y promoviendo así eventos inductivos secuenciales que aumentan la diversidad del destino celular en los tejidos. Todas estas interacciones celulares tienen como resultado final la restricción gradual del potencial de las células embrionarias, y su diferenciación final para dar lugar a todos los tipos celulares especializados que conforman el organismo adulto.

Esta tesis tiene como objetivo profundizar en nuestra comprensión de los mecanismos moleculares que establecen identidad celular durante el establecimiento del eje naso-temporal (NT) en el primordio de ojo en pez cebra. Nuestros estudios se han centrado en diseccionar la

implicación de tres vías de señalización en este proceso: la vía de los factores de crecimiento fibroblástico (Fgf), Hh y Nodal.

Vía de señalización de Fgf

Los ligandos Fgf deben su nombre al hecho de que se identificaron inicialmente en un extracto pituitario bovino que promovía el crecimiento de los fibroblastos del periostio (Armelin, 1973). Desde entonces, los Fgfs han sido involucrados en múltiples funciones durante el desarrollo embrionario y etapas postnatales. La activación de la vía de señalización de Fgf requiere la interacción de los ligandos de la vía, que constituyen un total de 18 tipos de proteínas secretables, con 4 tipos de receptores FGF tirosina kinasa. Esta interacción a su vez está regulada por cofactores de la familia de los proteoglicanos y por proteínas de unión extracelular. La interacción del ligando con su receptor promueve la dimerización del mismo, y su activación por fosforilación en residuos tirosina específicos. La activación de los receptores genera sitios de anclaje en su dominio citosólico para proteínas adaptadoras que activan a su vez las cascadas

de señalización intracelular RAS-MAPK, PI3K-AKT, PLC γ Y STAT (Ornitz and Itoh, 2015) (Figura 1).

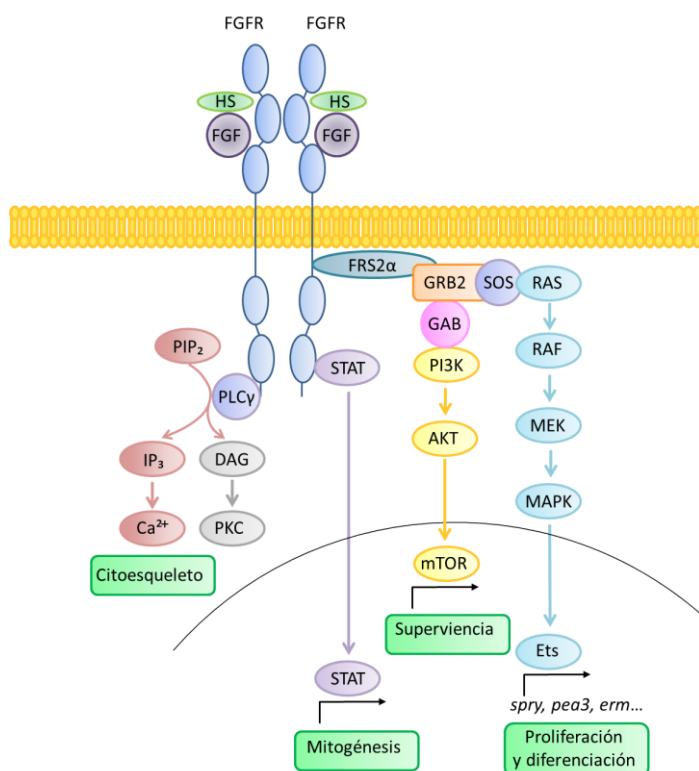


Figura 1. Vía de señalización de los Fgfs. La unión del ligando al receptor FgfR y al heparán sulfato forman un complejo ternario que induce la fosforilación del receptor y la activación de sus dominios intracelulares. La activación del receptor conduce a la interacción con proteínas adaptadoras que activan diferentes cascadas de señalización intracelular. Señalización mediada por RAS-MAPK: la interacción de FRS2 α con el receptor FgfR produce su fosforilación, reclutando a la proteína adaptadora GRB2, la cual a su vez recluta el factor SOS. SOS activa el enzima RAS GTPasa, el cual activa la vía de las MAP kinasas. Esta señalización conduce finalmente a la activación de

los factores de transcripción Ets, que modulan la expresión de genes diana como *pea3/etv4* y *erm/etv5b*, o reguladores negativos de la vía como *sprouty (spry)*. Vía de PI3K-AKT: el reclutamiento de GRB2 también recluta la proteína adaptadora GAB1, la cual activa el enzima PI3K que fosforila a AKT. AKT fosforilado permite finalmente la activación del complejo mTOR, permitiendo la supervivencia celular. Señalización de PLC γ : el receptor FgfR activo recluta y activa el enzima PLC γ , generando IP $_3$ y DAG a partir de la hidrólisis de PIP $_2$. IP $_3$ induce la liberación de iones de calcio y la activación de señalizaciones dependientes de calcio, como es la modulación del citoesqueleto celular. La fosforilación del receptor también induce la activación de la vía de señalización mediada por STAT, regulador transcripcional de genes implicados en ciclo celular.

Los miembros de la familia FGF funcionan en los estadios más tempranos del desarrollo embrionario y durante la organogénesis para mantener la supervivencia de las células progenitoras y mediar su crecimiento, diferenciación e implicación en la formación de patrones en el embrión. Además, los Fgfs también tienen funciones en la etapa adulta, estando involucrados en procesos de reparación, regeneración y función metabólica (Ornitz and Itoh, 2015).

Vía de señalización de Hh

El gen Hedgehog se identificó inicialmente en un cribado genético en la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*, en el cual se detectó un mutante cuyo fenotipo larvario se asemejaba a las espinas de los erizos; de ahí deriva su nombre (Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980). La señalización de Hh es fundamental en múltiples procesos a lo largo del desarrollo embrionario y en la homeostasis del tejido adulto, dirigiendo la formación de diversas estructuras en el embrión y la diferenciación celular. La desregulación de esta vía conduce a multitud de anomalías congénitas severas. Probablemente la más severa de ellas es la holoprosencefalia, que resulta del fallo del cierre del prosencéfalo en ausencia de la línea media ventral. Además, la activación persistente de la vía de Hh conduce al desarrollo de algunos cánceres (Briscoe and Therond, 2013).

La familia de los ligandos Hh consta de tres miembros en mamíferos y aves: Sonic hedgehog (Shh), Ihh (Indian hedgehog) y Desert hedgehog (Dhh); y seis en teleósteos: Shh, Ihh, Dhh más Tiggywinkle hedgehog (Twihh), Echidna hedgehog (Ehh), y Qiqihar hedgehog (Qhh). Estos ligandos se unen a sus receptores Ptch1/2 provocando la liberación del transductor de la vía Smoothened (Smo), que desencadena la cascada de señalización intracelular que en última instancia produce la activación transcripcional de genes regulados por los factores de transcripción Gli (Briscoe and Therond, 2013).

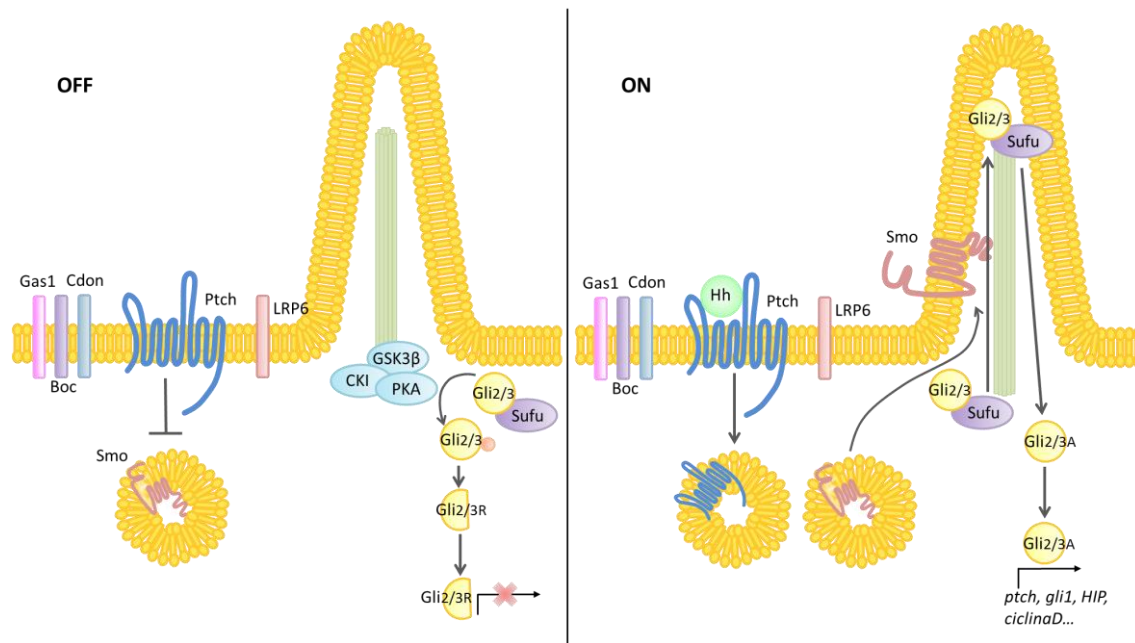


Figura 2. Vía de señalización de Hh. En ausencia de Hh, su receptor Patched (Ptch) se encuentra alrededor del cilio primario impidiendo el transporte de Smoothened (Smo) a la membrana. En la base del cilio, las proteínas Gli son fosforiladas por PKA, CKI y GSK3β. Esta fosforilación conduce a las proteínas Gli2/3 a su proteólisis, generando las formas represoras Gli2/3R, las cuales en el núcleo actúan inhibiendo la transcripción de los genes diana de la vía de Hh. En presencia de Hh en el medio, este se une a Ptch, interaccionando también con los correceptores Cdon, Boc, Gas1 y LRP6 y conduciendo el complejo a degradación. El resultado de este proceso es la liberación de Smo de la represión por Ptch y su translocación al cilio primario, en el cual es fosforilado y activado. La activación de Smo permite la disociación del complejo Sufu/Gli dentro del cilio, y el transporte de las formas activas de Gli2 y Gli3 al núcleo, donde actúan como reguladores transcripcionales de moduladores positivos (Gli1) y negativos (Ptch) de la vía, y de otros genes diana.

Los ligandos Hh actúan como morfógenos de largo alcance al ser secretados al medio extracelular. Su actividad es dependiente de la concentración de ligando y de la duración de la señalización, pudiendo producir diferentes respuestas celulares en múltiples tejidos, dependiendo del conjunto de genes activados en cada uno de ellos. Además, la actividad de Hh resulta en la inducción de genes que participan en la regulación de la propia vía, influyendo en la dispersión del ligando o en su cascada señalizadora intracelular (Briscoe and Therond, 2013) (Figura 2).

Vía de señalización de Nodal

Los ligandos de Nodal forman parte de la superfamilia de los factores de crecimiento transformantes β (TGFβ). Tienen un papel central en los primeros eventos de regionalización del embrión durante la gastrulación, siendo requeridos para la especificación de los ejes primarios,

la inducción del mesodermo y del endodermo y el establecimiento de la asimetría derecha-izquierda. La vía de Nodal tiene un papel fundamental en el mantenimiento de la pluripotencia de las células madre embrionarias. Alteraciones en sus niveles de actividad se han involucrado también en carcinogénesis (Abate-Shen and Shen, 2007).

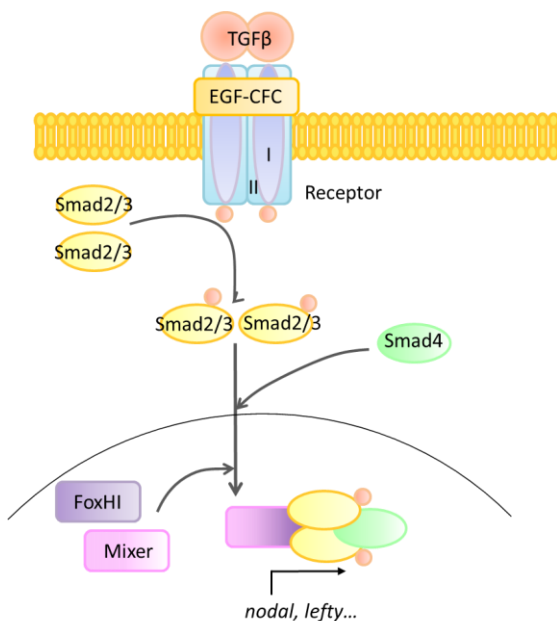


Figura 3. Vía de señalización de Nodal. Los ligandos TGFβ se unen a los receptores I y II, los cuales interactúan directamente con su correceptor EGF-CFC. Esto produce la fosforilación de los receptores y su activación, pudiendo éstos fosforilar a su vez a los factores citoplasmáticos Smad2/3. Smad2/3 interactúan con Smad4 formando un complejo transcripcional que se dirige al núcleo. Dentro del núcleo el complejo interactúa con el cofactor FoxH1 o Mixer, dando lugar a un complejo activo capaz de modular la transcripción de los genes diana de la vía. Entre los genes regulados por la señalización de Nodal se encuentran entre otros los propios ligandos de la vía, y un antagonista, *lefty*. Lefty antagoniza la vía de Nodal mediante su interacción con las proteínas EGF-CFC y con los ligandos, bloqueando la formación del complejo receptor.

Mientras que en ratón, humano y pollo sólo se ha encontrado un ligando Nodal, en pez cebra se han identificado tres: Cyclops, Squint y Southpaw, aunque llevan a cabo las mismas funciones que en amniotes (Feldman et al., 1998; Rebagliati et al., 1998; Sampath et al., 1998). Los ligandos de la vía de Nodal se unen a receptores kinasa serina-treonina I y II, y señalizan a través de la cascada de Smad2/3 (Figura 3). Para su señalización es esencial la interacción del receptor con el correceptor EGF-CFC, específico de la vía de Nodal. Encontramos dos miembros de correceptores EGF-CFC en mamíferos, Cripto y Cryptic, mientras que en pez cebra sólo se ha identificado uno, One-eyed pinhead (Oep) (Abate-Shen and Shen, 2007) (Figura 3).

Especificación y regionalización de la placa neural anterior

El sistema nervioso central de vertebrados deriva del neuroectodermo, el cual adquiere carácter neural al comienzo de la gastrulación. Durante la gastrulación, el neuroectodermo se condensa en el eje medio-lateral y se extiende en el eje AP para dar lugar a la placa neural, que a su vez sufrirá una extensa reorganización morfogénica y regionalización para dar lugar a las diferentes estructuras del sistema nervioso central.

La activación de β -catenina en una región discreta del embrión en pre-gástrula especifica el organizador primario dorsal (Buckles et al., 2004). El organizador es fuente de secreción de toda una serie de moléculas que protegen el ectodermo adyacente de adquirir identidad epidérmica, e inducen así identidad de neuroectodermo (Buckles et al., 2004). Simultáneamente a su inducción, el neuroectodermo comienza a regionalizarse a lo largo del eje AP. La señalización de Wnts crea un gradiente con bajos niveles en la porción anterior y niveles crecientes de Wnts hacia regiones mas posteriores. Este gradiente de Wnts especifica distintas identidades en el eje AP. Así, bajos niveles de Wnts son necesarios para la especificación de estructuras anteriores, mientras altos niveles de Wnts promueven la formación de estructuras mas posteriores del sistema nervioso central (Cavodeassi, 2014; Esteve and Bovolenta, 2006; Yamaguchi, 2001). Esta regionalización se revela por la expresión de una serie de factores de transcripción en dominios discretos del neuroectodermo. La interfaz entre distintos dominios en ocasiones da lugar a regiones organizadoras, denominadas organizadores secundarios, que a su vez comienzan a expresar y secretar moléculas de señalización que contribuyen a refinar gradualmente el patrón de la placa neural (Cavodeassi and Houart, 2012).

El resultado de esta regionalización inicial es la especificación del prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo, y la aparición de nuevos organizadores secundarios que continúan subdividiendo las regiones anteriores de la placa neural en sus principales territorios: telencéfalo, diencéfalo, hipotálamo y campo de ojo. Además de las moléculas de señalización secretadas por los organizadores, señales procedentes de los tejidos adyacentes contribuyen a la regionalización del prosencéfalo. Por ejemplo, Shh, emanando desde el mesodermo axial subyacente, es fundamental para inducir el hipotálamo (Marti and Bovolenta, 2002).

La inducción de identidad de ojo requiere la expresión combinada de los factores de transcripción Rx, Six3, Six6, Pax6 y Lhx2. Esta es suficiente para formar estructuras de retina, pero sólo en presencia de Otx2 (Zuber et al., 2003), indicando que Otx2 confiere al neuroepitelio la competencia necesaria para el inicio del desarrollo del ojo. Este grupo de genes implicados en la formación del ojo se expresan en dominios solapantes en la placa neural anterior. Por

ejemplo, *rx* y *six6* se expresan en el campo de ojo y el hipotálamo, pero sólo aquella región en la que se co-expresan con el resto de genes de especificación de ojo será la que se determinará como campo de ojo. Uno de los primeros genes de especificación de ojo en activarse en pez cebra es *rx3*, que ya define un dominio discreto del neuroectodermo anterior a mitad de gastrulación (Loosli et al., 2001).

- Segregación del campo de ojo de los territorios neurales adyacentes

La región más anterior del prosencéfalo, que dará lugar al campo de ojo y el telencéfalo, se especifica bajo la influencia del organizador secundario más rostral, el Borde Neural Anterior (BNA), localizado en el límite rostral de la placa neural anterior (Bielen and Houart, 2012; Houart et al., 2002). El BNA es fuente de antagonistas de Wnt, como la familia de *Sfrp*, cuya acción inhibitoria es requerida para la inducción del territorio de telencéfalo y de campo de ojo, y la represión de identidad diencefálica (Braun et al., 2003; Esteve et al., 2004; Houart et al., 2002; Wilson and Houart, 2004). La inhibición de la actividad de Wnt/ β -catenina en esta región de la placa neural anterior no solo se debe a la actividad de los *Sfrp*. *Six3*, expresado específicamente en el campo de telencéfalo, retina e hipotálamo reprime la transcripción de los ligandos Wnt1 y Wnt8, de tal manera que su expresión no se expanda a regiones anteriores de la placa neural anterior (Lagutin et al., 2003; Liu and Cvekl, 2017; Liu et al., 2010). Además la activación de la vía no canónica de Wnt (independiente de β -catenina) en el campo de ojo mediada por Wnt11, antagoniza la señalización de Wnt/ β -catenina, refinando el borde entre el campo de ojo y el diencefalo (Cavodeassi et al., 2005).

El ectodermo adyacente a la placa neural anterior expresa altos niveles de BMPs, otra familia de moléculas secretadas al medio extracelular. Los BMPs son necesarios para promover identidad telencefálica en el borde anterior de la placa neural y, al mismo tiempo, restringir identidad de retina mediante la represión de la expresión de *rx3* (Bielen and Houart, 2012). En última instancia la segregación precisa entre los progenitores de la retina y los progenitores telencefálicos depende de la expresión restringida de distintos factores en dichos territorios. Por ejemplo, *Rx3* y BMP se requieren para restringir la expresión del receptor de quimioquinas *Cxcr4a* al campo de ojo. *Cxcr4a* a su vez mantiene la segregación entre células del campo de ojo y células de territorios adyacentes durante la morfogénesis de la placa neural anterior (Bielen and Houart, 2012).

El resultado final de esta secuencia de eventos es la subdivisión del sistema nervioso central en diferentes dominios. Uno de ellos es el campo de ojo, territorio en cuya descripción ahondaremos a continuación.

Morfogénesis del campo de ojo

- Evaginación de las vesículas ópticas:

Una vez especificada y regionalizada la placa neural, esta se pliega para formar el tubo neural. En paralelo, en la región más anterior, el campo de ojo evagina de las paredes laterales del tubo en formación dando lugar a las vesículas ópticas. Los mecanismos que dirigen la evaginación no se conocen con precisión, pero el proceso se ha estudiado en mucho detalle en el pez cebra (*Danio rerio*) y el pez medaka (*Oryzias latipes*).

La evaginación de las vesículas ópticas en peces va acompañada por un cambio gradual de la morfología celular y la adquisición de polaridad apico-basal en las células progenitoras del primordio de ojo (Ivanovitch et al., 2013). Las primeras células que llevan a cabo esta transformación son las células situadas en la región más lateral del primordio de ojo. Según avanza el proceso, las células restantes que conforman el núcleo central del campo de ojo comienzan a elongarse y polarizarse, integrándose en el neuroepitelio lateral mediante un proceso de intercalación y dando lugar a las vesículas ópticas (Ivanovitch et al., 2013) (Rembold et al., 2006) (Figura 4). Esta adquisición de polaridad apico-basal de las células del primordio de ojo, requerida para la correcta evaginación de las vesículas ópticas, viene determinada por la expresión de *pard6cb*, un marcador de polaridad apical, y por la acumulación de Laminina1 rodeando el dominio del primordio de ojo (Ivanovitch et al., 2013).

De manera simultánea a la evaginación de las vesículas ópticas, las células con identidad telencefálica convergen y se polarizan en dos etapas consecutivas. Primero migran hacia la línea media rápidamente, y posteriormente se polarizan en este territorio (Rembold et al., 2006) (Figura 4). Esta diferencia en la migración de los progenitores neurales se debe, en parte, a los niveles de expresión de la molécula de adhesión celular Nlcam, que se expresa en altos niveles en los precursores telencefálicos y a bajos niveles en los precursores del ojo. Altos niveles celulares de Nlcam conllevan una migración hacia la línea media (Brown et al., 2010).

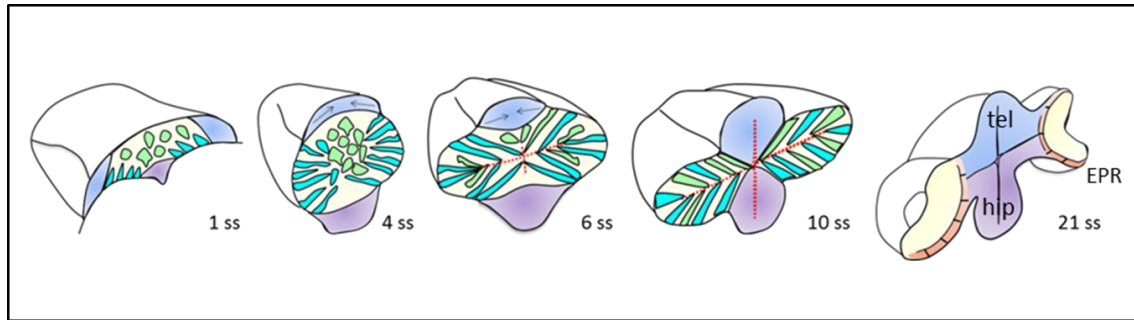


Figura 4. Morfogénesis del campo de ojo. A estadio de placa neural (1 ss), sólo parte de las células que conforman el campo de ojo están ancladas a la lámina basal (células azules). Una vez que el campo de ojo se ha compactado en la línea media (4 ss), las células exteriores (células azules) presentan características epiteliales mientras que el resto (células verdes) forman un núcleo central sin polaridad. Según comienzan a evaginar las vesículas ópticas de las paredes laterales del primordio de ojo (6 ss) las células centrales comienzan a expresar marcadores de polaridad y a anclarse a la lámina basal. Cuando las vesículas ópticas han evaginado completamente (10 ss), están formadas por un epitelio pseudoestratificado. En etapas posteriores las vesículas ópticas se pliegan sobre sí mismas para formar las copas ópticas (21 ss). Parte de las células de la vesícula óptica se diferencian en epitelio pigmentario (naranja), un epitelio monoestratificado escamoso que recubre externamente las copas ópticas. La capa interna de la copa óptica, en contacto con la lente, da lugar a la retina (amarillo). El dominio azul corresponde al primordio telencefálico, mientras que el dominio morado constituye al hipotálamo. La línea punteada roja resalta la región apical de las vesículas ópticas.

La polarización y migración diferencial que sufren las células telencefálicas y del campo de ojo está controlada en parte por algunos de los componentes de la red regulatoria génica que orquesta su adquisición de identidad. Por ejemplo, Rx3 controla positiva y negativamente genes directamente involucrados en promover estos procesos. Entre los genes regulados por Rx3 se encuentran *pard6* y *cxcr4*, cuya expresión es inducida por Rx3, y *nrcam* y *epha4/B4*, cuya expresión es reprimida por Rx3 (Brown et al., 2010; Ivanovitch et al., 2013) (Bielen and Houart, 2012) (Cavodeassi et al., 2013).

- Plegamiento de las copas ópticas:

Una vez las células del primordio del ojo han evaginado completamente formando un neuroepitelio, las células de la porción distal comienzan a invaginar, iniciando el plegamiento de las vesículas ópticas para formar las copas ópticas mediante un proceso que implica reorganizaciones extensas del tejido (Fuhrmann, 2010) (Figura 4).

El plegamiento de las copas ópticas ocurre simultáneamente a la subdivisión del primordio de ojo en tres dominios: la retina neural, que se desarrolla a partir de la porción ventral y distal de las vesículas ópticas; el epitelio pigmentario de la retina, que emerge de la región próximo-dorsal; y el tallo óptico, especificado en la zona antero-proximal de las mismas

(Fuhrmann, 2010). Ambos eventos están finamente coordinados, siendo esencial la regionalización de la copa óptica para su correcto plegamiento. Por ejemplo, la diferenciación de las células del epitelio pigmentario de la retina implica un cambio acusado de forma. Estas células adquieren una morfología escamosa y aumentan su superficie para recubrir toda la capa externa de la copa óptica. Este cambio de morfología celular podría proporcionar parte de la fuerza que dirige el correcto plegamiento de las copas ópticas (Kwan et al., 2012). Por otro lado, el lado basal de las células de la retina presenta un enriquecimiento en componentes de adhesión focal, necesario para promover la constricción de la superficie basal de la retina y su plegamiento durante la morfogénesis de la copa óptica (Martinez-Morales and Wittbrodt, 2009). La invaginación de la copa óptica también es dependiente de la interacción entre el neuroepitelio de la retina y el ectodermo adyacente y la placoda de la lente, que invagina de manera coordinada con la copa óptica (Hyer et al., 2003; Smith et al., 2009). Sin embargo, a pesar de que ambos procesos están finamente coordinados, la lente no parece ser necesaria para el plegamiento en sí, como sugiere la generación de copas ópticas in vitro a partir de células madre embrionarias de mamífero, que procede en ausencia de lente (Eiraku et al., 2011; Nakano et al., 2012).

Especificación de la vesícula óptica en retina neural, epitelio pigmentario de la retina y tallo óptico

La especificación de retina neural, epitelio pigmentario y tallo óptico requiere la actividad de toda una serie de señales secretadas por tejidos circundantes. La actividad de los Fgfs secretados desde la placoda de la lente contribuye a la especificación de la retina, mientras que Wnts y BMPs desde el mesénquima periocular especifican lo que será el epitelio pigmentario (Fuhrmann et al., 2000; Muller et al., 2007; Steinfield et al., 2013).

Fgfs, Wnts y BMPs controlan la expresión de factores de transcripción en cada uno de estos dominios. Estos a su vez establecen mecanismos de represión transcripcional recíproca, que se traducen en el mantenimiento y refinamiento del borde entre dominios (Kwan et al., 2012). El factor de transcripción Lhx2 está presente en todos los progenitores del campo de ojo y la vesícula óptica y regula la expresión de los primeros determinantes de la retina neural y del epitelio pigmentario de la retina, Vsx2 y Mitf respectivamente (Yun et al., 2009; Zuber et al., 2003). La actividad de Fgfs refuerza y mantiene la expresión de *vsx2* en la retina, y este a su vez controla la red génica que promueve la adquisición de identidad de retina neural (Bharti et al., 2012; Fuhrmann, 2010; Medina-Martinez et al., 2009). Por otro lado, la actividad de Wnts y

Bmps refuerza la expresión de *mitf* y *otx2* en el epitelio pigmentario de la retina. Una vez establecidos los dominios de retina neural y epitelio pigmentario, la represión mutua entre *Mitf* y *Vsx2* mantiene y refina esta subdivisión (Zou and Levine, 2012).

El tallo óptico deriva de células posicionadas en la región proximal de las vesículas ópticas, las cuales formarán un epitelio plano que se plegará sobre sí mismo sirviendo de guía para la salida de los axones de las CGR. La especificación de este territorio está regulada por las vías de señalización de Nodal y Hh, cuyos ligandos emanan desde la línea media. Nodal y Hh son necesarios para el establecimiento y mantenimiento del tallo óptico, a la vez que restringen las señales inductoras de identidad distal como BMP (Lupo et al., 2005; Peters, 2002).

Shh se expresa a lo largo de la línea media ventral del embrión, y está involucrado en diferentes aspectos de la regionalización neural durante el desarrollo embrionario en vertebrados (Patten and Placzek, 2000). El gradiente de difusión de Shh tiene un papel esencial en la regionalización del campo de ojo. Así, los niveles altos de señalización presentes en la porción más proximal de las vesículas ópticas, activan directa o indirectamente la expresión de los determinantes de identidad proximal Pax2, Vax1 y Vax2, induciendo identidad de tallo óptico. De manera opuesta, la porción distal de la vesícula óptica, que recibe bajos niveles de Hh, genera retina neural, y expresa el marcador distal *pax6*, reprimido a su vez por la actividad de Shh (Chow and Lang, 2001; Macdonald et al., 1995). La sobreexpresión de Shh conlleva la expansión del tallo óptico a expensas de la retina (Cardozo et al., 2014; Ekker et al., 1995; Macdonald et al., 1995; Take-uchi et al., 2003; Varga et al., 2001). En contraposición, mutaciones en Shh resultan en defectos en la formación de estructuras ventrales del sistema nervioso, produciendo por tanto fenotipos cíclopes (Macdonald et al., 1995; Rohr et al., 2001). De igual manera, defectos en la expresión de los determinantes proximales Pax2, Vax1 y Vax2, afectan al desarrollo del tallo óptico, produciendo anomalías en el cierre de este tejido que conllevan a la falta del cierre de la fisura óptica y defectos de guía axonal (conocido como coloboma) (Macdonald et al., 1997; Take-uchi et al., 2003).

Componentes de la familia de Nodal desempeñan un papel crucial para varios aspectos de la formación del patrón de la línea media ventral, incluyendo el establecimiento de territorios ventrales en el cerebro, y la inducción de la expresión de Shh en estos territorios (Muller et al., 2000; Rebagliati et al., 1998; Sampath et al., 1998). La expresión de los genes *vax* se ve severamente reducida o ausente en embriones *cyclops* y *oep*, con actividad reducida de Nodal, indicando que la señalización de Nodal se requiere para la regionalización del área preóptica, el tallo óptico y la retina ventral (Take-uchi et al., 2003).

Además de Nodal y Shh, los Fgfs y ácido retinoico expresados en el tallo óptico y la región circundante también contribuyen al establecimiento de esta estructura proximal de las vesículas ópticas (Lupo et al., 2005; Reifers et al., 2000; Reifers et al., 1998; Shinya et al., 2001). Embriones carentes de la actividad de Fgf y ácido retinoico muestran ausencia de la expresión de los genes *vax* en el área preóptica, mientras que su sobreexpresión expande el tallo óptico y ventraliza la retina, reprimiendo carácter dorsal (Lupo et al., 2005; Take-uchi et al., 2003). La falta simultánea de la actividad de Hh, Fgf y ácido retinoico conduce a una fuerte dorsalización, mientras que la ausencia de las mismas independientemente causa efectos más suaves; estos resultados sugieren que todas estas vías de señalización cooperan entre sí, reforzando su actividad ventralizadora (Lupo et al., 2005).

Una vez establecida la identidad de tallo óptico, Pax2 y Pax6, expresados en dominios complementarios de la vesícula óptica, se reprimen mutuamente, refinando y manteniendo el límite entre tallo y retina, mecanismo similar al observado en el borde entre retina neural y epitelio pigmentario.

Regionalización del eje naso-temporal

Además del establecimiento del eje PD, durante estadios tempranos de su formación las vesículas ópticas se subdividen en una región dorsal y una región ventral. Estos territorios darán lugar posteriormente a los dominios nasal y temporal de la retina, respectivamente.

Los factores de transcripción Foxg1 y Foxd1 son los primeros determinantes conocidos de identidad NT (Carreres et al., 2011; Hatini et al., 1994; Takahashi et al., 2009; Tao and Lai, 1992). Su expresión se restringe, desde un principio, a dominios complementarios del prosencéfalo, Foxg1 en el telencéfalo y la mitad dorsal del primordio de ojo, y Foxd1 en el hipotálamo y la mitad ventral del territorio de ojo (Hatini et al., 1994) (Figura 5).

Estudios previos han demostrado que los Fgf son señales fundamentales para la expresión regionalizada de *foxg1* y *foxd1*. Fgf8/3 se expresan en el telencéfalo y Fgf24 en la placoda olfativa, todas ellas estructuras dorsales del tubo neural, y son necesarios para activar y confinar la expresión del marcador nasal *foxg1* en la mitad dorsal del primordio del ojo. En ausencia de estos Fgfs, *foxg1* no se expresa y el marcador de identidad temporal *foxd1* se expande a toda la mitad dorsal del primordio de ojo, confiriendo identidad temporal a todo el primordio. Por el contrario, cuando Fgf8 se expresa ectópicamente en la mitad ventral de la vesícula óptica, la expresión del marcador nasal *foxg1* se expande sólo parcialmente, mientras

que la expresión del marcador temporal *foxd1* está parcialmente reprimida (Picker and Brand, 2005; Picker et al., 2009). La incapacidad de la ganancia de señalización de Fgf para promover una transformación completa a nasal del futuro dominio temporal de la vesícula óptica sugiere la existencia de otra vía de señalización que, en paralelo a la actividad de Fgf, promueva la adquisición de identidad temporal en el dominio ventral de las vesículas ópticas.

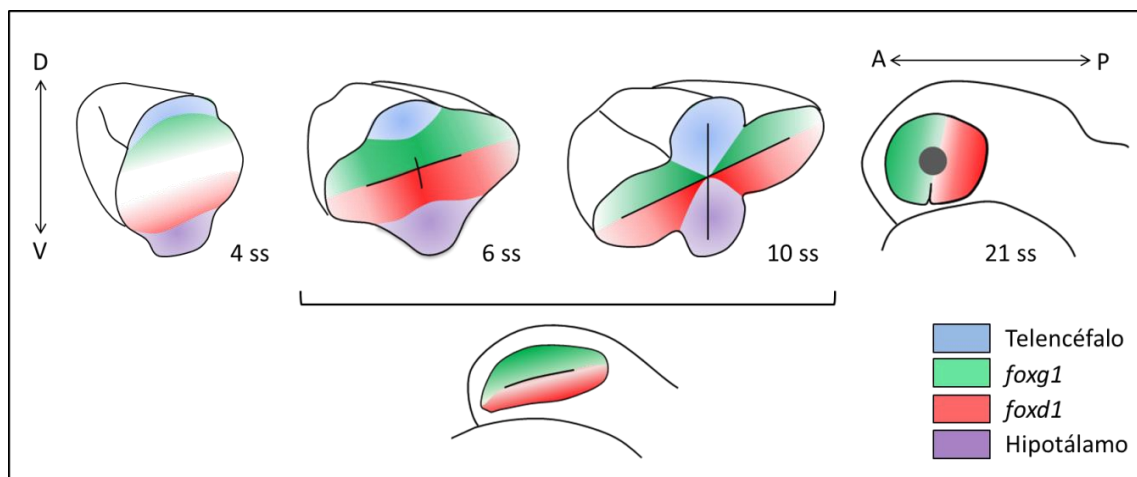


Figura 5. Subdivisión NT del primordio de ojo. Los determinantes NT *foxg1* y *foxd1* comienzan a expresarse en el primordio del ojo a 4 ss, antes del inicio de la evaginación de las vesículas ópticas. A 6 ss los dominios de expresión son complementarios y están restringidos a la mitad dorsal y ventral de las vesículas ópticas. El borde entre dominios se establece nítidamente al final de la evaginación a 10 ss. Durante el plegamiento de la copa óptica, ésta rota anteriormente disponiéndose el eje NT de la retina a lo largo del eje AP del embrión.

El patrón de expresión complementario de *foxg1* y *foxd1* en el ojo se mantiene hasta estadios más tardíos del desarrollo. Durante su plegamiento, la copa óptica rota de tal manera que las células situadas en la región dorsal se posicionan en la región anterior (nasal) del primordio. De manera paralela, estas células se compactan y generan un neuroepitelio columnar, dando lugar a la región nasal de la retina (Picker et al., 2009). A medida que la copa se pliega, las células situadas en la región ventral de la vesícula óptica se compactan de manera similar y se relocalizan a la capa interna de la copa, apostada a la lente, de tal forma que acaban situadas en la región posterior (temporal) de la retina (Picker et al., 2009) (Figura 5).

Diferenciación de la retina y formación del mapa retinotectal

La subdivisión temprana del primordio de ojo en territorios con una expresión restringida y complementaria de *foxd1* y *foxd1*, se traduce en el establecimiento de los dominios nasal y temporal en la retina diferenciada. Al finalizar el tercer día tras la fecundación, el sistema visual del pez cebra ya es funcional y la larva es capaz de detectar estímulos visuales (Easter and Nicola, 1996).

En pez cebra, tras el plegamiento y formación de las copas ópticas, se activa un programa transcripcional que culminará con la diferenciación y ensamblaje de todos los tipos neuronales que componen la retina madura (Harris, 1997). La diferenciación neuronal de la retina sigue un proceso muy estereotipado, según el cual varias ondas de diferenciación se propagan por el tejido, comenzando en la región ventro-nasal, y extendiéndose circularmente hacia la porción nasal, dorsal, y finalmente temporal (Huh et al., 1999; Schmitt and Dowling, 1996). La primera onda de diferenciación da lugar a CGR, células amacrinas y conos (Hu and Easter, 1999; Nawrocki et al., 1985; Poggi et al., 2005). Este primer episodio de diferenciación es el que mejor se ha estudiado, y su propagación se puede visualizar gracias a la activación secuencial del gen *ath5*, que codifica para un factor de transcripción neurogénico (Brown et al., 1998; Masai et al., 2000).

La neurogénesis conlleva el posicionamiento de los diferentes tipos neuronales en capas, generando una estructura laminar altamente estereotipada en la cual se organizan seis tipos neuronales (células ganglionares, amacrinas, bipolares, horizontales, conos y bastones) y un tipo glial (glía de Muller). La capa de neuronas situada en la región más interna, adyacente a la lente, se denomina la capa de las células ganglionares de la retina, y como su nombre indica en ella se disponen las CGR. A continuación, en la denominada capa nuclear interna se localizan los somas de las células amacrinas, bipolares, horizontales y la glía de Müller. Seguidamente, se encuentra la capa nuclear externa, donde se disponen los fotorreceptores -conos y bastones-. Por último, en la región más externa y en contacto directo con el epitelio pigmentario, se dispone la capa de los segmentos de los fotorreceptores (Cepko, 2014). La capa de fotorreceptores del pez cebra contiene cinco tipos de células fotorreceptoras, organizadas en un patrón regular denominado “mosaico fotorreceptor”. Encontramos un tipo de bastones y 4 tipos de conos, que difieren en su sensibilidad al espectro lumínico- (Branchek and Bremiller, 1984; Nawrocki et al., 1985; Robinson et al., 1993). Entre las tres capas que contienen los somas de los diferentes tipos neuronales de la retina, se encuentran las capas plexiformes externa e interna, donde se alojan los procesos de las neuronas de la retina y conectan entre ellas (Figura 6).

La información visual es captada por los fotorreceptores y enviada a través de las células bipolares hasta las CGR, las cuales transmiten esta información directamente a las células diana en el tectum, donde se procesa. Las células amacrinas y horizontales tienen una función de interconexión celular entre las CGR y los fotorreceptores respectivamente (Schulte and Bumsted-O'Brien, 2008). Los axones de las CGR se dirigen hacia la superficie interna de la retina recorriéndola hasta la salida por el disco óptico, se extienden por el nervio óptico y atraviesan la región ventral del diencefalo hacia la línea media (Burrill and Easter, 1995; Macdonald et al., 1997), la cual cruzan formando el quiasma óptico.

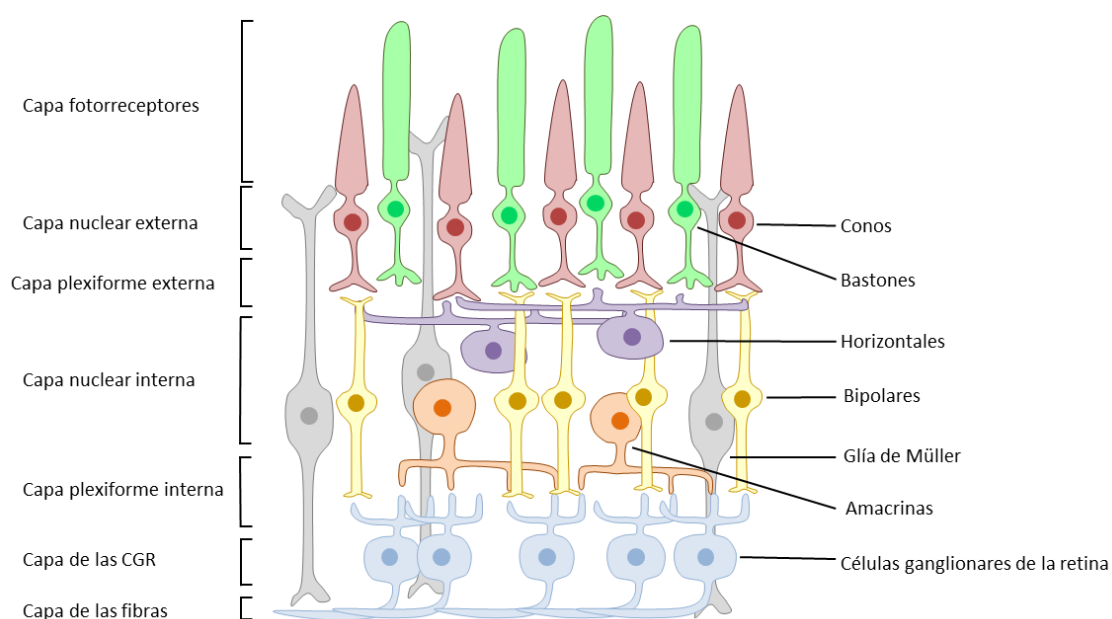


Figura 6. Estructura de la retina en vertebrados. Los diferentes tipos neuronales de la retina se organizan en capas formando una estructura laminar.

La relación espacial entre las CGR se reproduce con precisión en su innervación en el tectum. Las coordenadas espaciales de la retina y el tectum están invertidas. Así, las CGR nasales proyectan en el tectum óptico posterior, mientras que las temporales innervan el tectum anterior. De igual manera, tras cruzar la línea media, los axones de las CGR de la retina dorsal se agrupan formando la rama ventral del tracto óptico, que una vez alcanzado el tectum innervará la región lateral, mientras que los axones procedentes de la retina ventral se agrupan en la rama dorsal innervando finalmente el tectum medial (Baier et al., 1996; Karlstrom et al., 1996; Stuermer, 1988). A los 3dpf los axones de toda la retina ya han innervado su destino final en el cerebro. El centro de procesamiento visual principal es el tectum; además, los axones de las CGR

inervan otros nueve núcleos mucho más pequeños en el cerebro del pez cebra, anteriores al tectum (Burrill and Easter, 1995).

La regionalización axial de la retina se traduce en una distribución diferencial de factores de transcripción, los cuales modulan la expresión de moléculas de membrana que contribuyen a la correcta inervación espacial de los axones de las CGR en el tectum. Por ejemplo, *Foxg1*, en la retina nasal, induce la expresión de *SOHo1*, *SH6*, *ephrinA2* y *ephrinA5* a la vez que reprime la expresión de *epha3* y de *foxd1* en ratón y pollo (Takahashi et al., 2003; Yamagata et al., 1999); de igual manera, la expresión de los determinantes de identidad dorso-ventral (DV) *Tbx5* y *Vax* regulan la expresión de los receptores *EphB*, esenciales para la correcta regionalización en el eje DV de los axones de las CGR (Koshiba-Takeuchi et al., 2000; Schulte et al., 1999).

Los axones, mediante el cono de crecimiento, una estructura sensitiva y dinámica situada en el extremo del axón de la neurona, responden ante las moléculas de guía axonal para dirigir correctamente su crecimiento y posterior inervación hacia los núcleos visuales (Erskine and Herrera, 2007; Erskine and Herrera, 2014; Feldheim and O'Leary, 2010). Existen diversas familias de moléculas de guía axonal: Efrinas-Eph, DCC-Netrinas/Unc, Slits-Robo y Semaforinas-Neuropilinas/Plexinas, las cuales actúan de manera similar y cuyo mecanismo de acción ha sido ampliamente diseccionado (Erskine and Herrera, 2007; Erskine and Herrera, 2014).

Las células de la glía juegan un papel esencial en el crecimiento de los axones de las CGR, expresando moléculas inhibitorias como *Sema5A*, *Slit2*, o el factor de transcripción *Vax1*, que favorecen la agrupación de los axones y la formación del quiasma óptico (Erskine and Herrera, 2014; Fricke et al., 2001; Kim et al., 2014). Además, diversas moléculas de señalización secretadas desde la retina y los tejidos circundantes también son de gran relevancia en la generación de los circuitos neuronales. Por ejemplo, *Shh* actúa a nivel de la retina favoreciendo la salida de los axones, y a nivel de quiasma óptico, donde la alta expresión en los bordes del quiasma repele los axones evitando su dispersión en el eje AP. (Erskine and Herrera, 2014; Sanchez-Camacho and Bovolenta, 2008) (Figura 7).

Los gradientes complementarios de receptores Eph en la retina y sus ligandos efrina en el tectum tienen un papel fundamental en el proceso de formación del mapa retinotectal. La señalización mediada por EphA/ephrinA controla la regionalización NT de la retina en el tectum mediante la regulación de la ramificación topográficamente a lo largo del eje AP del tectum. De manera similar, la disposición DV en la retina de las CGR se plasma en el eje medio-lateral del tectum mediante la señalización regulada por EphB/ephrinB (McLaughlin et al., 2003). Las efrinas muestran un gradiente diferencial en la retina y el tectum, con mayores niveles de

efrinas-A en la región nasal de la retina y la región caudal del tectum, y de efrinas-B en la región dorsal y lateral de los mismos. De igual forma, encontramos gradientes opuestos de los receptores Eph, presentando mayor concentración en el dominio temporal y ventral de la retina, y en el dominio anterior y medial del tectum (Erskine and Herrera, 2007; Erskine and Herrera, 2014) (Figura 7).

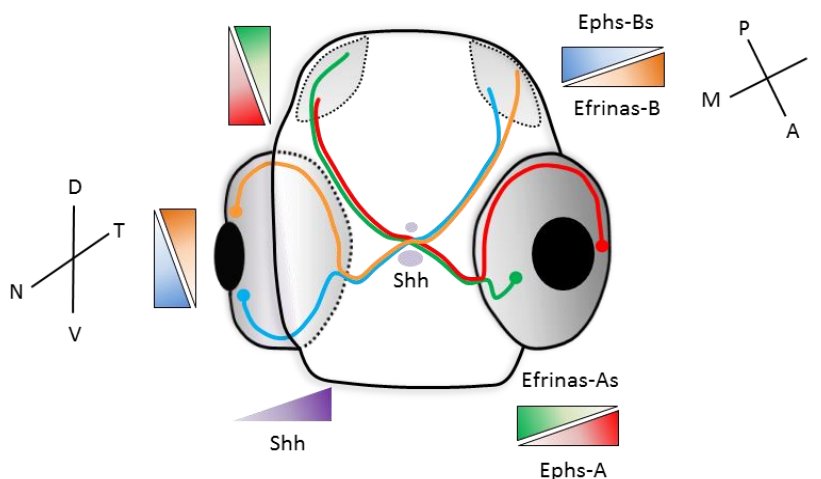


Figura 7. Gradiente de efrinas/Ephs y Shh en la retina y el tectum de pez cebra. Las efrinas y sus receptores Eph generan gradientes de expresión opuestos tanto en la retina como en el tectum, dirigiendo la invasión de los axones de las CGR. Las efrinas-A se expresan en mayor concentración en la retina nasal y el tectum posterior, mientras que los receptores Eph-A lo hacen en la retina temporal y el tectum anterior. De igual manera las efrinas-B presentan un gradiente decreciente DV en la retina y LM en el tectum, y sus receptores Eph-B generan un gradiente creciente DV en la retina y LM en el tectum. Shh presenta un gradiente creciente en la retina, menor en la porción distal, y mayor en la porción proximal, favoreciendo la salida de los axones por el disco óptico. Su presencia en los bordes del quiasma impide la dispersión de los axones en el eje AP.

La importancia de una correcta regionalización axial para el establecimiento del mapa retinotectal se ve resaltada en situaciones en las que se manipula dicha regionalización. Por ejemplo, la falta de función de Fgf resulta en la falta de *foxd1* y la expansión de *foxg1* en el primordio de ojo. Esto a su vez resulta en la expansión de *EphA4b* y la represión de *efnA5*. Consecuente con la modificación en la expresión de estos genes, la falta de actividad de Fgf provoca defectos en el establecimiento del mapa retinotectal; en estas condiciones la invasión de las células ganglionares de la retina se da predominantemente en la región anterior del tectum, la que recibe en condiciones normales la invasión de la retina temporal (Picker and Brand, 2005).

El resultado final de todos estos procesos es el establecimiento de un circuito neuronal finamente construido, que recibe, procesa e interpreta los estímulos visuales.

OBJETIVOS

La capacidad de procesar y representar información visual está determinada por la comunicación precisa entre la retina, el órgano que recibe los estímulos visuales y los transforma en estímulos nerviosos, y los centros visuales primarios en el cerebro, que procesan e interpretan estos estímulos. La inervación de las áreas visuales primarias en el cerebro por las CGR establece el mapa de inervación retinotectal; la morfología del ojo y la correcta topología de estas inervaciones en el tectum dependen del patrón axial de la retina. El primer proceso en la regionalización axial de la retina es su subdivisión en los dominios nasal y temporal. El eje NT de la retina se correlaciona con el patrón AP del tectum, por lo que alteraciones en la expresión de marcadores NT conlleva defectos en la retina y en el mapa retinotectal. A pesar de que los procesos de guía axonal entre la retina y el tectum se han estudiado en detalle, los mecanismos moleculares involucrados en promover y mantener la regionalización NT durante el desarrollo de la retina de vertebrados no se conocen totalmente. El objetivo global de esta tesis es profundizar en nuestra comprensión de este proceso. Para ello, hemos utilizado el pez cebra como modelo animal, y nos hemos concentrado en los siguientes objetivos:

- 1) Determinar la implicación de la actividad de Shh, Nodal y Rx3 en la regionalización NT de la retina.
- 2) Estudiar las relaciones reguladoras existentes entre los diferentes componentes moleculares involucrados en la especificación de identidad nasal y temporal.
- 3) Analizar la importancia de una correcta subdivisión NT de la retina para la función visual.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas de peces y mantenimiento

Las estirpes de pez cebra (*Danio rerio*) adultas fueron mantenidas y criadas acorde a los procedimientos estándar (Westerfield, 1993). El estadio de desarrollo ha sido determinado acorde a su morfología (Kimmel et al., 1995) (Figura 8), y a partir de 24 horas de desarrollo postfertilización, según horas/días tras la fertilización (h/dpf).

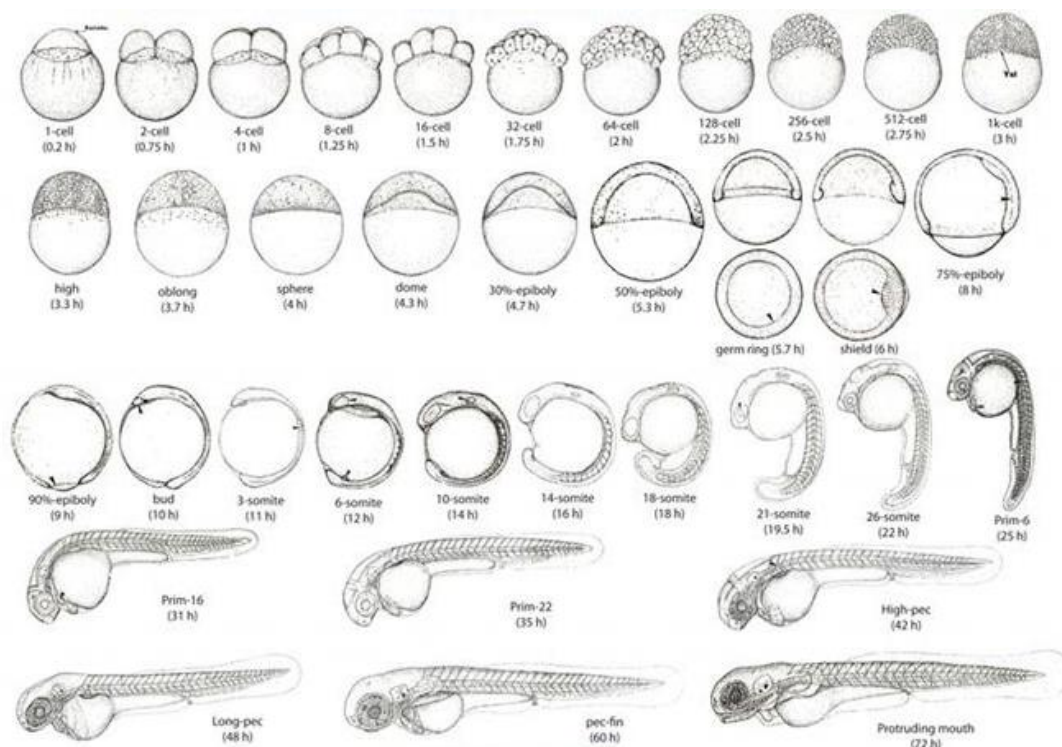


Figura 8. Secuencia de estadios de desarrollo del embrión de pez cebra desde una célula hasta 72 hpf (Kimmel et al, 1995).

Las líneas silvestres de pez cebra utilizadas en este trabajo son *AB* y *tup1*; las líneas transgénicas *tg{rx3::Gal4-VP16}^{vu271Tg}* (Weiss et al., 2012), *tg{ptch2::kaede}^{ta4596Tg}* (Huang et al., 2012), *tg{rx3::GFP}^{ET95/1}* (Brown et al., 2010) (Rembold et al., 2006) y *tg{emx3::YFP}^{b1200}* (Viktorin et al., 2009) y las líneas mutantes *smu^{b641}* (*slow muscle omitted*) (Varga et al., 2001), *ace^{ti282a}* (*acerebellar*) (Brand et al., 1996), *oep^{m134}* (*one-eyed pinhead*) (Schier et al., 1996), *cyclops^{m294}* (Schier et al., 1996), *chokh^{s399}* (*chk*) (Loosli et al., 2003), *foxd1* (cedida por el laboratorio de Corine Houart, Kings College London, Londres, Reino Unido) y *foxd1^{cbm16}* (generada como parte de esta tesis).

Los embriones de la población de superficie y de la cueva de la especie *Astyanax mexicanus* se obtuvieron del laboratorio de Yoshiyuki Yamamoto (University College London,

Londres, Reino Unido). Los experimentos realizados con esta especie se hicieron en colaboración con el grupo del Profesor Steve Wilson (University College London, Reino Unido).

Los embriones fueron recolectados y desarrollados en medio E3 y fijados a 4 ss (somite stage), 10-12 ss, 48 hpf o 5 dpf en paraformaldehído 4% en PBS (PFA).

Generación del alelo nulo *foxd1*cbm16 utilizando la técnica CRISPR-Cas9

La secuencia del gen diana *foxd1* fue extraída del buscador Ensembl (código de acceso: ENSDARG00000029179). El ARN guía específico para la secuencia diana del gen fue identificado utilizando el buscador UCSC Genome Browser (<http://genome.uscs.edu>). Este ARN guía, ubicado en posición 5' de la secuencia que codifica para el dominio de unión a ADN, consta de la secuencia de la polimerasa T7 para transcribirlo y una secuencia complementaria al cebador universal oligoB flanqueando la secuencia complementaria a la región diana del gen *foxd1* (Figura 9).



Figura 9: Secuencia del ARN guía del CRISPR contra el gen *foxd1*.

Para la generación del ARN guía primero se amplificó la secuencia con la ADN polimerasa Expand high fidelity (Roche) y se transcribió in vitro con el Kit commercial Maxi script T7 (NEB) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la síntesis del ARN mensajero (ARNm) del enzima Cas9, se linearizó el plásmido PCS2-nCas9n (Addgene, #47929) con el enzima de restricción NotI. Posteriormente se purificó por columna (PCR clean up, roche) y se transcribió in vitro siguiendo el protocolo del SP6 mMessage mMachine Kit (Ambion).

La F0 se generó coinyectando el ARN guía (25ng/ul) y el ARNm del enzima Cas9 (300ng/ul) en embriones silvestres a estadio de desarrollo de una célula.

La eficiencia de la mutagénesis dirigida contra *foxd1* mediada por CRISPR se comprobó utilizando la técnica CRISPR STAT (Carrington et al., 2015). Esta técnica permite detectar modificaciones en el ADN por delección o inserción de nucleótidos de hasta una única base. Para ello, se extrae el ADN genómico de un grupo de los embriones inyectados (5-10 embriones) a 48 hpf y se amplifica con tres cebadores, dos de ellos específicos que flanquean la región diana. El cebador delantero consta de la secuencia de unión de la polimerasa del fago M13 precediendo

a la secuencia complementaria al gen. El cebador reverso contiene la secuencia “pig-tailed” antes de la secuencia reversa complementaria del gen, para evitar que la ADN polimerasa añada errores al amplificar la región (Tabla 1). El tercer cebador consta de la secuencia complementaria a la secuencia de unión de la polimerasa del fago M13 marcado fluorescentemente con el fluorocromo FAM. La presencia de este último cebador permite la cuantificación por niveles de fluorescencia de los productos de PCR, y la detección de distintas especies.

Tras comprobar que nuestro ARN guía induce mutaciones, se dejaron crecer los embriones inyectados restantes hasta los dos meses de desarrollo. Alcanzado el estadio adulto se cruzó la F0 con especímenes silvestres para obtener la F1. La F1 adulta se analizó por CRISPR STAT detectando individuos que portaban una delección de 10 pares de bases. Este producto de PCR se subclonó utilizando el kit comercial StrataClone PCR Cloning Kit (Aligent Technologies) y se secuenció, comprobando que la mutagénesis dirigida por CRISPR había producido una delección de 10 pares de bases desde la posición 172 a la 181 del marco abierto de lectura (ORF) del gen. Esto provoca el cambio del marco de lectura del *foxd1* y produce un codón de parada prematuro en el aminoácido 70, dando lugar a una proteína truncada sin función biológica.

Genotipado

Los especímenes *foxd1^{cbm16}* y *foxg1* - portador de una delección de 5 pares de bases del nucleótido 33 al 37 del ORF- se genotiparon mediante CRISPR STAT según lo descrito en el apartado anterior, utilizando cebadores específicos (tabla 1). Los individuos adultos de la línea transgénica *Tg{rx3::gal4}* portadores del transgén se genotiparon mediante PCR con cebadores que amplifican la secuencia que codifica para el factor de transcripción Gal4 (tabla 1).

Gen	Cebador delantero 5'→3'	Cebador reverso 5'→3'
<i>foxd1</i>	TGTAACGACGGCCAGTTCAGATGCACGACGAGATC	GTGTCTTGTCACAAATCTCGCTCAGC
<i>foxg1</i>	TGTAACGACGGCCAGGCCAGAGCAAGAGATTCTG	GTGTCTTTAGCGCAAGTGTCTCTCC
<i>gal4</i>	ATGAAGCTACTGTCTTCTATC	CGATACAGTCAACTGTCTTTG

Tabla 1. Cebadores genotipado líneas mutantes y transgénica.

Clonaje de plásmidos para inyección

Las construcciones UAS de los genes *shh*, *fgf8*, *foxg1* y *foxd1* se generaron subclonando el ADN complementario en el vector bidireccional UAS/tol2, que dirige la transcripción de la proteína verde fluorescente (GFP) hacia una dirección y la del gen de interés en la otra dirección (Distel et al., 2010; Kajita et al., 2014).

El gen *shh* de pollo (*Gallus gallus*) se extrajo del plásmido pBluescript (cedido por el laboratorio de Cliff Tabin) con las enzimas de restricción Sall y SacII y se introdujo direccionalmente con estas mismas enzimas en el plásmido UAS/tol2. El gen *fgf8* procedente de ratón (*Mus musculus*) (NM_001166362) se extrajo del plásmido PCIG (cedido por el laboratorio de Ruth Diez del Corral) con las enzimas de restricción SmaI y ClaI, y se modificó como para insertarlo en el vector de destino UAS/tol2. Tanto la secuencia de la proteína *shh* de pollo como la de *fgf8* de ratón presentan una alta homología con las del pez cebra en los dominios funcionales y tienen la misma actividad que los genes endógenos (Figura 10).

Fgf8 danio rerio	MRLIPSRLSYLFHLFAFCYYAQVTIQSPNFTQHVSEQSKVTDVSRRLIRTYQLYSRT	60
Fgf8 mus musculus	.GSPR.A..C.L...LVL.LQ...V..S.....R...L...QL.....	60
Fgf8 danio rerio	SGKHVQVLANKKTTAMAEDGDVHAKLIVETDTFGSRIRIKGAETGFYICMNRGKLGKK	120
Fgf8 mus musculusRIN.....PF.....V.VR.....L.....KK.....A.S	120
Fgf8 danio rerio	NGLGKDCIFSEIVLENNYTALQNVKYEYMAFTRKGRPRKSGSKTRQHGREVHFMKRLPK	180
Fgf8 mus musculus	..K...V.T.....A.....R	180
Fgf8 danio rerio	GHQIAEHR-PFDFINYP-FNRR--TKRTRYSGER	210
Fgf8 mus musculus	..HTT.QSLR.E.L...P.T.SLRGSQ..WAPEP.	215
Shh danio rerio	M---RLLTRVLLVSLTSLVSVGLACGPGRGYGRRRHPKKLTPLAYKQFIPNVAEKTLGASG	60
Shh gallus gallus	.VEML...I...GFICAL..S...T.....I.K.....	63
Shh danio rerio	RYEGKIRNTERFKELTPNYPDIIFKDEENTGADRLMTQRCKDKLNSLAISVMNHWPQVKLR	123
Shh gallus gallusR.....A.....Q.....	126
Shh danio rerio	VTEGWDEGDGHFEESLHYEGRAVDITTSDRDKSKYGTLSRLAVEAGFDWYYESKAHHC SVK	186
Shh gallus gallusS.....R.....M.A.....	189
Shh danio rerio	AENSVAAKSGGCFPGSALVSLQDGGQKAVKDLNPGDKVLAADSAGNLVFSDFIMFTDRDSTTR	249
Shh gallus gallusT.H.EH..T.L...S...R.....AD.R.LY...LT.L...MDSS.	252
Shh danio rerio	RVFYVLETQEPVEKITLTAHLLFVLNDSTEDLHMT---AAYASSVRAGQKVMVDDSGQ-	307
Shh gallus gallus	KL.....RQ.RARLL.....APQHNQSEA.GSTSGQ.LF..N.KP..R.Y..LGEG..Q	315
Shh danio rerio	-LKSVIVQRIYTEEQRGSFAPVTAHGTIVVDRILASCYAVIEDQGLAHLAFAPARLYYYVSSF	369
Shh gallus gallus	L.PASVHSVSLR..AS.AY..L..Q...LIN.V.....EHSW..W...F..AQGLLAA	378
Shh danio rerio	LFPQNSSSRSNATLQQEGVHWYSRLLYQMGTWLDNMLHPLGMSVNSS	418
Shh gallus gallus	.C.DGAIPATAAT.TT---I.....RI.S.V..GDA.....VAPA.	425

Figura 10. Alineación de las secuencias de las proteínas Fgf8 y Shh de pez cebra con las de ratón y pollo respectivamente. Fgf8 posee los dominios de unión al receptor y al heparán sulfato, que actúa como cofactor, entre los aminoácidos 60 y 180 aproximadamente, secuencia que presentan alta homología entre pez cebra y ratón. Shh sufre un proceso de autocatálisis para dar lugar al dominio N-terminal y C-terminal. El dominio N-terminal, que contiene la actividad señalizadora, termina alrededor del aminoácido 190 en ambas especies, y presenta alta homología entre pez cebra y pollo.

Los genes *foxg1* y *foxd1* de pez cebra (*Danio rerio*) se amplificaron de ADN copia de embriones de 48 hpf. Se utilizaron cebadores específicos que contienen las secuencias de las

dianas de las enzimas de restricción EcoRV (cebador delantero) y NotI (cebador reverso) (tabla 2) y se insertaron direccionalmente en el plásmido UAS/tol2.

Gen	Cebador delantero 5' → 3'	Cebador reverso 5' → 3'
<i>foxd1</i>	GGGGATATCATGTTGGATATGGGAGA	CCCGCGGCCGCTTAGTGTATAAGTGGATTG
<i>foxd1</i>	GGGGATATCATGACTCTGGGAACGGACAT	AAAGCGGCCGCTAGAAATGGCAATTG

Tabla 2. Cebadores clonaje *foxd1* y *foxd1*.

Microinyección de plásmidos

Las construcciones generadas se utilizaron para expresar los genes *shh*, *fgf8*, *foxd1* y *foxd1* ectópicamente en el primordio de ojo utilizando el sistema UAS/Gal4 (Halpern et al., 2008). La inyección se realizó a estadio de desarrollo de una célula en embriones de la línea transgénica *Tg{rx3::Gal4}* a una concentración de 20-40 pg/embrión. Los embriones que mostraban una expresión homogénea de GFP en las vesículas ópticas fueron seleccionados para llevar a cabo los análisis realizados durante esta tesis doctoral.

Microinyección de ARNm y trasplantes

Los trasplantes se realizaron esencialmente como se describe en Cavodeassi et al 2005. Células indiferenciadas procedentes de embriones donantes a estadio de esfera se trasplantaron en embriones receptores silvestres en estadio 60% epibolia en la región del neuroectodermo que dará lugar al primordio del ojo. Los embriones donantes fueron previamente microinyectados en el vitelo a estadio de desarrollo de una célula, con ARNm de Shh (100pg/nl) y ARNm de la GFP, o únicamente ARNm de la GFP. Los trasplantes de células silvestres en embriones *chk* y viceversa se realizaron de la misma manera, inyectando ARNm de la GFP en los embriones donantes para cada condición.

El ARNm de *shh* y *gfp* se sintetizó utilizando el mMessage Machine kit (Ambion), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Detección de ARN mensajero

Las sondas antisentido de ARNm para hibridación *in situ* se sintetizaron utilizando ARN polimerasas (Promega) y nucleótidos marcados con fluoresceína o digoxigenina (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. La hibridación *in situ* se realizó en todos los casos en el embrión entero según protocolo previamente descrito (Cavodeassi et al, 2013)(Yamamoto et al, 2004).

Los embriones fueron incubados con anti-digoxigenina/fluoresceína-AP (Roche) y revelados con los sustratos NBT/BCIP (precipitado morado) y INT/BCIP (precipitado rojo) o fast red (precipitado rojo) (Roche). Para la detección de ARN mensajero por fluorescencia, los embriones se incubaron con anti-digoxigenina-POD (Roche) y revelados con el sustrato Cy3 del kit comercial TSA Fluorescein System (PerkinElmer).

Las sondas utilizadas fueron: *foxd1*, *foxg1a*, *mab21/2*, *nkx2.1*, *shh*, *fgf8*, *sprouty4*, *pea3*, *erm1*, *emx3*, *rx3*, *rtk2*, *efna5a*, *gli1* y *ptch2*. Las secuencias codificantes para *ptch2* (ENS DART00000077304) y *gli1* (ENS DARG00000101244) se obtuvieron a partir de ADNc de embriones de 24 hpf utilizando cebadores específicos (Tabla 3). En el caso de *ptch2* y *gli1* se añadió al cebador reverso la secuencia de unión de la T3 y T7 polimerasa, respectivamente, para transcribir la sonda directamente. Se transcribió con la polimerasa T3 y T7 (Promega).

Gen	Cebador delantero 5' → 3'	Cebador reverso 5' → 3'
<i>ptch2</i>	ACAACTGTCAGCGTAGGAC	TCCATTAACCCCTCACTAAAGGGAATATATAATTTATAAATGT CT
<i>gli1</i>	CCCATGTCCAATGCCTTAGAACAC C	TAATACGACTCACTATAGGGCTTACAGTAGTGACCGAAATA CC

Tabla 3. Cebadores sondas *ptch2* y *gli1*.

Inmunofluorescencia

La detección de antígenos por fluorescencia *in toto* se llevó a cabo según protocolo previamente descrito (Cavodeassi et al, 2013). Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-GFP hecho en pollo (1:1000, Abcam) y anti-βcatenina hecho en ratón (1:400, Signal Transduction Laboratories). Los anticuerpos secundarios fueron Alexa-488 y -647 (1:500, Jackson ImmunoResearch). La tinción de los núcleos se llevó a cabo incubando los embriones con Sytox Orange (Life Technologies, 1:10,000).

Tratamientos con inhibidores

Los tratamientos farmacológicos se realizaron incubando sobre una cama de agarosa al 1% embriones decorionados en medio E3 con ciclopamina (100 μ M, Calbiochem), SU5402 (10 μ M, Calbiochem), SB431542 (75 μ M, Tocris) o una combinación de los mismos. La ciclopamina, SU5402 y SB431542 se disolvieron en DMSO. Los controles para estos tratamientos se incubaron en la misma cantidad de medio E3 con la concentración equivalente de DMSO. Los tratamientos con los inhibidores se iniciaron a estadio de desarrollo de 70% epibolia o 1 ss y se detuvieron a 10-12 ss fijándolos con PFA 4% para su posterior análisis.

Para manipular simultáneamente la vía de Fgf y Hh, los embriones *tg{rx3::Gal4}* se microinyectaron con la construcción UAS:fgf8 a estadio de una célula, y se incubaron desde 70% epibolia con ciclopamina. Estos embriones se fijaron a 10-12 ss, se seleccionaron aquellos con expresión homogénea de GFP en los ojos, y se guardaron para su posterior análisis.

Trazado de proyecciones retinotectales

El trazado de los axones de las CGR de embriones silvestres, *tg{rx3::Gal4};UAS:Shh* y *foxd1^{-/-}* se realizó usando una solución de 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina (DiI, D282, Molecular Probes) y 3,3'-dioctadeciloxacarbocianina (DiO, D275, Molecular Probes) disueltos en dimetilformamida/sacarosa. Se inyectaron dichas soluciones independientemente en la retina nasal y temporal de los embriones previamente fijados en paraformaldehído a estadio de desarrollo de 6 dpf, y se incubaron a temperatura ambiente durante 24 horas.

Test de respuesta optocinética

Las medidas de la respuesta optocinética (ROC) se hicieron con un sistema de análisis de producción propia (laboratorio de Isaac Bianco, UCL). Este sistema consta de un proyector AAXA P2 Jr que refleja el estímulo visual sobre un espejo posicionado en un ángulo de 45 grados. Este está subyacente a una base transparente sobre la que se posiciona la placa en el interior de un cilindro opaco sobre el cual se proyecta el estímulo visual. La iluminación del estímulo es de 850 nm de luz LED. La cámara utilizada es una AVT Pike, con una velocidad de 100 fps.

Las larvas de pez cebra se anestesiaron con metasulfonato de tricaína (70 μ g/ml). Cada larva se incluyó individualmente en una gota de agarosa de bajo punto de fusión al 1% en agua

del sistema de peces en una placa Petri de 35 mm. Una vez solidificada la gota se cubrió toda la superficie de la placa hasta sobrepasar la altura de la gota de agarosa con agua del sistema de peces, y posteriormente se retiró con un microbisturí la agarosa que rodea a cada ojo hasta liberarlos completamente permitiendo su total movimiento pero manteniendo el resto del embrión completamente inmovilizado. La placa se situó en el sistema de análisis de la ROC en el interior del cilindro sobre el que se proyecta el estímulo.

El rastreo del movimiento de los ojos se llevó a cabo en tiempo real utilizando un programa personalizado escrito en LabVIEW (National Instruments). Las imágenes se ajustaron aplicando un umbral detectando los dos objetos binarios más grandes como los ojos. La orientación de los ojos se calculó utilizando la imagen central y la medida del ángulo de los ojos relativa a la línea media anatómica del embrión, dibujada manualmente. Ángulos con valores crecientes corresponden con la rotación de los ojos en sentido de las agujas del reloj, y viceversa.

Orden del estímulo visual	Velocidad	Frecuencia espacial	Contraste
1	10	12	0,05
2	10	12	0,1
3	10	12	0,25
4	10	12	0,5
5	10	12	1
6	10	24	1
7	10	36	1
8	10	48	1
9	10	60	1
10	30	12	1
11	60	12	1
12	90	12	1

Tabla4. Valores de velocidad, frecuencia espacial y contraste de cada estímulo visual de la secuencia proyectada.

La ROC se mide en términos de ganancia (velocidad del ojo en la fase lenta de la sacada, dividida entre la velocidad del estímulo). La ROC depende de tres variables: velocidad, frecuencia espacial y contraste del estímulo, por lo que se realizó un ensayo que consta de doce estímulos visuales con una duración de 15 segundos cada uno en los que se varía el valor de

cada una de estas variables manteniendo las dos restantes constantes con un valor máximo (Tabla 4). Esta secuencia se proyectó por duplicado calculándose el valor de la ganancia para cada estímulo como la media de las dos repeticiones.

La dirección del estímulo fue unidireccional en las agujas del reloj, siendo temporo-nasal para el ojo izquierdo y naso-temporal para el derecho.

Montaje de embriones y adquisición de imagen

Los embriones de las líneas transgénicas *tg{ptch2::kaede}*, *tg{emx::gfp}* y *tg{rx3::gfp}*, los *chk^{-/-}* inmunoteñidos con anti- β catetina y Sytox, los trasplantados con células sobreexpresando el ARNm de *shh*, y los embriones trazados con Dil/DiO fueron embebidos enteros en agarosa de bajo punto de fusión (Sigma) 1.5% en PBS y orientados en posición frontal o dorsal. La adquisición de imágenes se realizó con un microscopio confocal Zeiss LSM710 y un objetivo de larga distancia de trabajo de inmersión en agua con un aumento 40x (0.8/NA).

Los embriones hibridados *in situ* se analizaron en el eje dorsal y frontal. Para analizarlos desde dorsal, fueron deshidratados en concentraciones crecientes de glicerol hasta alcanzar una concentración de 75% glicerol en agua y montados sin vitelo en una gota de glicerol 100%. Para analizarlos en el eje frontal, parte de los embriones se embebieron en gelatina/BSA para secciones de vibratomo siguiendo el protocolo previamente descrito (Sanchez-Arrones et al., 2013), o bien se incubaron en una solución de sacarosa al 15% en PBS, posteriormente se embebieron en una solución 7.5% gelatina en 15% sacarosa, se congelaron con isopentano y se almacenaron a -80°C para realizar crio-secciones. Secciones de 20 μ m se obtuvieron con el vibratomo Leica VT1000S y se montaron en glicerol 100%. Crio-secciones de 15 μ m se realizaron con el criostato Leica CM 1950 y se montaron en moviol. Las imágenes se adquirieron un microscopio Leica CTR 5000 conectado una cámara digital (Leica DFC 500) operado por un programa de Leica, equipado con objetivos secos 20x 0.7/NA (utilizado para las imágenes desde dorsal) y 40x 0.8/NA (utilizado para las imágenes en el plano frontal). Todas las imágenes se adquirieron en formato Tiff y se analizaron con Fiji/ImageJ.

Procesamiento de datos

- Cuantificación extensión de *foxg1*:

La cuantificación de la extensión de la expresión de *foxg1* en los embriones carentes de la señalización de Fgf y Hh se llevó a cabo dividiendo el valor de la extensión de la expresión (x)

entre la longitud total de la vesícula óptica (d) (Figura 11). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba T student con un $p \leq 0.05$.

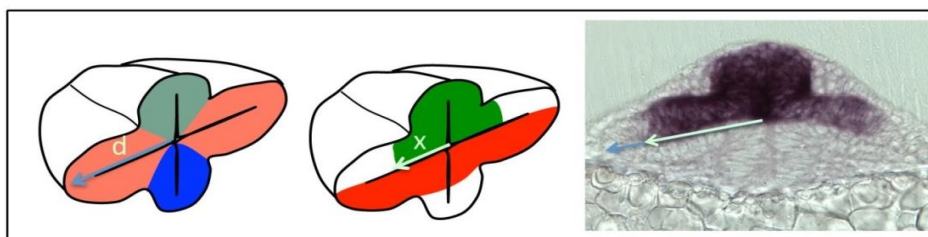


Figura 11. Estrategia de cuantificación de la extensión de la expresión de *foxg*. “X” es el valor de la expresión y “d” la longitud total de la vesícula óptica.

- Análisis estadístico de la respuesta optocinética:

La significancia estadística del test de ROC se ha determinado utilizando un test ANOVA doble, seguido de un test de Bonferroni. Para cada grupo de estudio, se han analizado los parámetros frecuencia espacial, velocidad y contraste. El análisis estadístico se ha realizado con el programa GraphPad Prism5.

- Embriones analizados en cada experimento:

Todos los experimentos llevados a cabo durante esta tesis han sido realizados en un número estadísticamente significativo de embriones. Los tratamientos con inhibidores han sido realizados un mínimo de dos repeticiones, y más de 20 embriones por condición cada vez. Los trasplantes se realizaron en varios días obteniendo el fenotipo mostrado en más del 50% de los embriones. Los experimentos llevados a cabo con mutantes han sido realizados en al menos 30 embriones por genotipo. Las sobreexpresiones mediante inyecciones de plásmidos se realizaron en más de 15 embriones para cada gen analizado y condición. El test de ROC se realizó en más de 20 embriones *Tg{rx3::gal4}; UAS;shh* y 80 embriones mutantes para *foxd1*.

RESULTADOS

1. La inhibición de la señalización de Hh resulta en la pérdida de identidad temporal de las vesículas ópticas.

Estudios previos han demostrado que los Fgf son señales fundamentales para la expresión regionalizada de *foxg1* y *foxd1*. Como se describe en la introducción, Fgf8, Fgf3 y Fgf24 activan y confinan la expresión de *foxg1* en la mitad dorsal del primordio del ojo (Picker and Brand, 2005; Picker et al., 2009). En ausencia de los ligandos Fgfs, *foxg1* no se expresa y *foxd1*, cuya expresión es exclusivamente ventral en condiciones normales, se expande a toda la mitad dorsal del primordio de ojo. Sin embargo, la expresión ectópica de Fgfs en la mitad ventral del primordio de ojo no elimina completamente la expresión de *foxd1*, lo que sugiere que debe haber una señal procedente de la región ventral del embrión responsable de la inducción de *foxd1* en este territorio. Shh se expresa a lo largo de la línea media ventral del embrión, próximo a la mitad ventral del primordio del ojo durante su desarrollo (Lupo et al., 2006), constituyendo un candidato perfecto para controlar la expresión de *foxd1*.

Para analizar una posible implicación de Shh en controlar la expresión de *foxd1*, analizamos la expresión de los marcadores de identidad nasal y temporal, Foxg1 y Foxd1 respectivamente, en embriones carentes de la señalización de Hh, como son los mutantes *smoothened* (*smu*, falta de función del co-receptor de Hh Smoothened) (Varga et al., 2001). Este análisis revela la pérdida de la expresión de *foxd1* en la mitad ventral de las vesículas ópticas (Fig. 12A-B,E,K-L). La expresión del marcador nasal *foxg1* no se ve afectada de manera alguna, manteniéndose restringida al dominio dorsal del primordio del ojo (Fig. 12C-D,F,K-L).

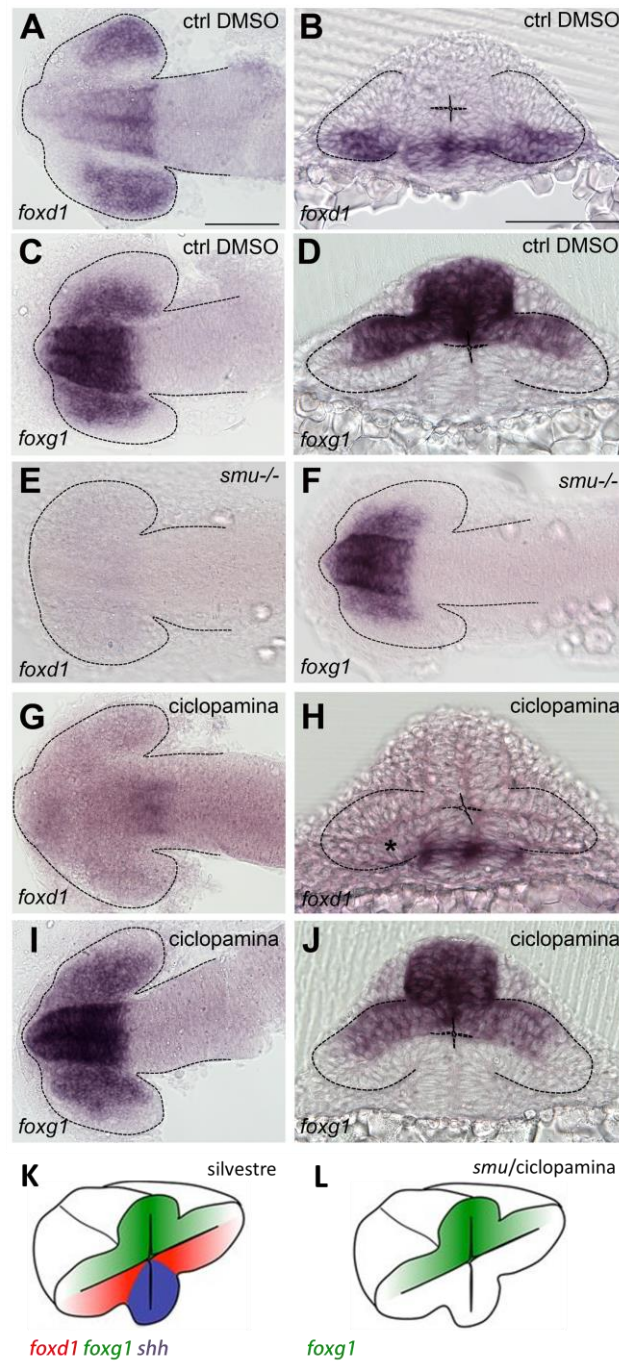


Figura 12. La falta de señalización de Hh resulta en la ausencia de *foxd1* en las vesículas ópticas. Vista dorsal (A, C, E, F, G e I) y frontal (B, D, H, J) de la expresión de *foxg1* (C, D, F, I, y J) y *foxd1* (A, B, E, G y H) en embriones control (A-D) y carentes de la señalización de Hh (E-J). Mutantes *smu* (E, F) y tratados con ciclopamina a partir de 1 ss (G-J). Esquema de la expresión de *foxg1* (verde), *foxd1* (rojo) y *shh* (morado) desde una vista frontal en un embrión silvestre (K) y carente de la actividad de Hh (L). Asterisco (*)=carente de identidad temporal. Las líneas punteadas delimitan el prosencéfalo desde una vista dorsal, y las vesículas ópticas desde una vista frontal.

La actividad de la vía de señalización de Hh es requerida en múltiples aspectos de la regionalización embrionaria desde estadios muy tempranos, anteriores a la especificación del campo de ojo. Por ello, para descartar que el fenotipo observado en los mutantes *smu* no sea debido a un efecto indirecto de la ausencia de señalización de Hh en etapas anteriores del desarrollo embrionario, realizamos la manipulación de la actividad de Hh en una ventana temporal discreta, haciendo uso de la ciclopamina, un antagonista de Smoothened (Chen et al., 2002). La utilización de esta droga nos permite restringir la ventana temporal en la cual inhibimos la señalización de Hh, y por tanto determinar el estadio de desarrollo en el cual la actividad de Hh es requerida para promover la expresión de *foxd1*. Mientras que tratamientos con ciclopamina de 6 ss en adelante no muestran efecto alguno sobre la expresión de *foxd1* (Fig. 13B-D), tratamientos a partir de 1-3 ss, anteriores a la evaginación de las vesículas ópticas, resultan en la ausencia de la expresión de *foxd1* (Fig. 12G-H,L). Al igual que observamos con los mutantes de falta de actividad de Hh, la expresión de *foxg1* no se ve afectada por estos tratamientos (Fig. 12I-J,L; Fig. 2A-C).

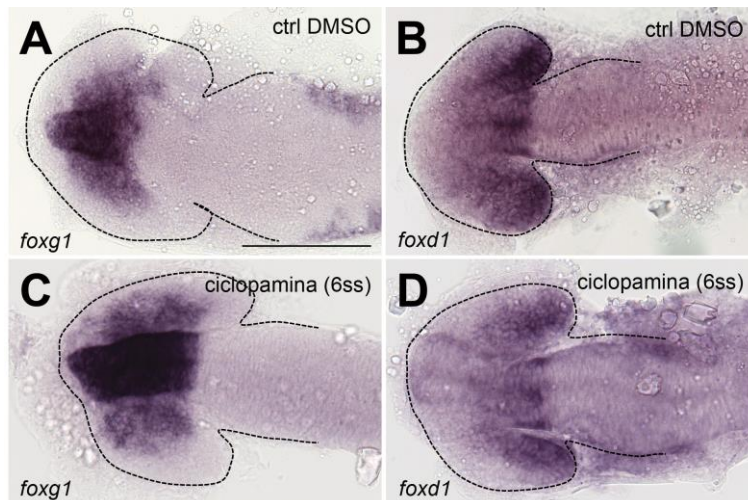


Figura 13. La actividad de Hh es requerida antes de 6 ss para la inducción de *foxd1*. Vista dorsal de la expresión de *foxg1* (A y C) y *foxd1* (B y D) en embriones control (A y D) y carentes de la señalización de Hh mediante tratamientos con ciclopamina a partir de 6 ss. Las líneas punteadas delimitan el prosencéfalo desde una vista dorsal.

En conjunto, el análisis del mutante *smu* y de los embriones tratados con ciclopamina indica que la señalización de Hh es necesaria para inducir la expresión de *foxd1*. La función de Hh es necesaria en estadios anteriores a 6 ss, cuando las vesículas ópticas están comenzando a evaginar. De manera consistente, el patrón de expresión de *foxg1* y *foxd1* ya está espacialmente restringido a la mitad dorsal y ventral, respectivamente, del primordio de ojo, a 4 ss (Fig. 14A-D).

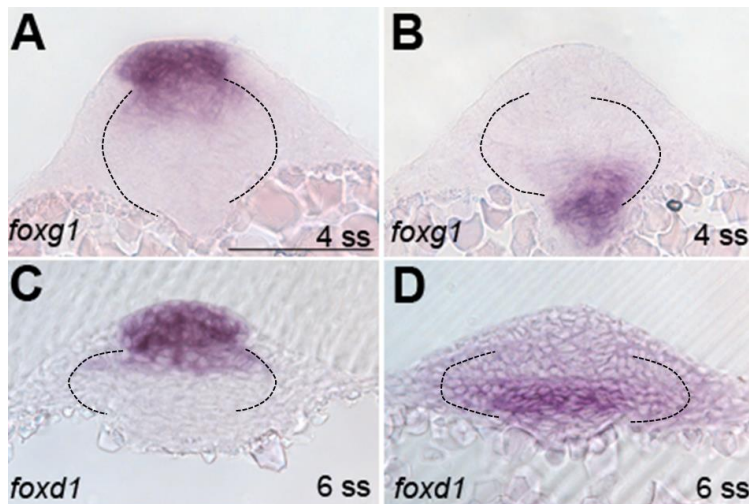


Figura 14. *foxg1* y *foxd1* comienzan a expresarse antes de la evaginación de las vesículas ópticas. Vista frontal de la expresión de *foxg1* (A y C) y *foxd1* (B y D) en embriones control a estadio de 4 ss (A y B) y 6 ss (C y D). Las líneas delimitan las vesículas ópticas.

2. La actividad ectópica de Hh suprime identidad nasal e induce identidad temporal en las vesículas ópticas.

Los experimentos de falta de señalización de Hh indican que éste es necesario para inducir identidad temporal en la mitad ventral del primordio de ojo mediante la activación de la expresión del factor de transcripción *Foxd1* en ese territorio a estadios muy tempranos del desarrollo del sistema visual. Sin embargo, no nos indican si la actividad de Hh es suficiente para inducir su expresión.

Para determinar si Hh es suficiente para inducir *foxd1*, procedimos a sobreexpresar el ligando de la vía, Shh, de manera controlada tanto espacial como temporalmente exclusivamente en el campo de ojo, haciendo uso de la técnica UAS/Gal4 (Halpern et al., 2008). Para ello, realizamos el clonaje de un plásmido bidireccional que contiene el cDNA de Shh y de la proteína fluorescente GFP –que actuará como reportera–, cuyas expresiones están bajo el control de las secuencias reguladoras UAS. Dicho plásmido fue inyectado a estadio de una célula en embriones de la línea transgénica *Tg{rx3:Gal4}*. En ellos el factor de transcripción Gal4 se encuentra bajo el control del promotor del gen *rx3*, que se expresa específicamente en el primordio de ojo desde el momento de la especificación del campo de ojo hasta el final de la evaginación de las vesículas ópticas.

La sobreexpresión de Shh induce la expansión de la expresión de *foxd1* en todo el primordio de ojo (Fig. 15A-B), a su vez que la completa ausencia de la expresión de *foxg1* en la mitad dorsal del mismo (Fig. 15C-D). Esta aproximación experimental no interfiere con el establecimiento de la subdivisión primaria del prosencéfalo, como se observa al analizar el dominio de expresión telencefálica de *foxg1* (Fig. 15C-D), y del marcador *mab21/2* que se

expresa en todo el territorio que conforman las vesículas ópticas y el mesencéfalo (Fig. 15E-F). El mismo fenotipo resulta al expresar en mosaico el ARN mensajero de *Shh* junto con el de GFP como reportero- lo que genera grupos discretos de células con la vía de Hh activada (Fig. 15I-L'). Para confirmar la activación de la vía de Hh en los embriones *Tg{rx3::Gal4}; UAS:shh*, analizamos los niveles de expresión del gen reportero de la vía *ptch2* en el primordio de ojo, y confirmamos que están fuertemente incrementados en los embriones manipulados (Fig. 15G-H).

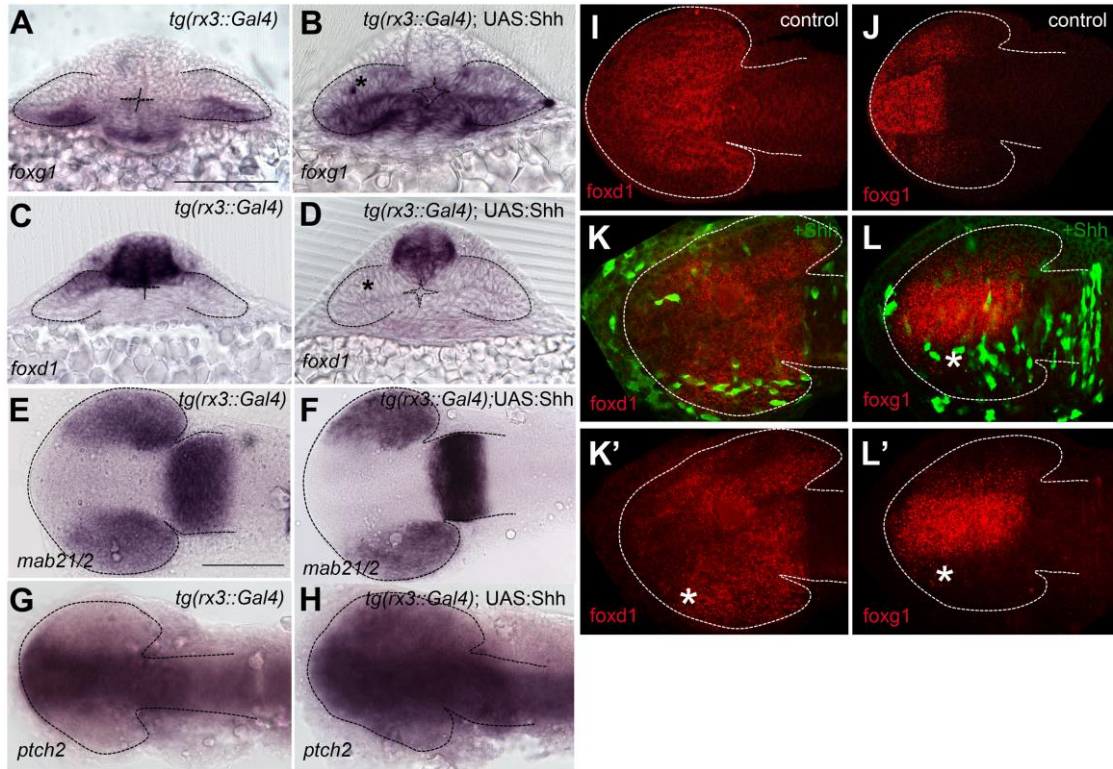


Figura 15. La expresión ectópica de *Shh* en el primordio de ojo promueve la expresión de *foxd1*. Vista frontal (A-D) y dorsal (E-H) de la expresión de *foxd1* (A y B), *foxg1* (C y D), *mab21/2* (E y F) y *patch2* (G y H) en embriones *Tg{rx3::gal4}* (A, C, E y G) y embriones *Tg{rx3::gal4}; UAS:shh* con sobreexpresión ectópica de *Shh* en las vesículas ópticas (B, D, F y H). Vista dorsal de la expresión de *foxd1* (I, K y K') y *foxg1* (J, L y L') en embriones control (I y J) y en embriones con células trasplantadas que sobreexpresan el ARNm de *shh* junto con el de *GFP* como reportero (K-L'). El asterisco (*) señala la ganancia de expresión de *foxd1* (B,K,K') o pérdida de expresión de *foxg1* (DL,L') en las vesículas ópticas. Las líneas punteadas delimitan el prosencéfalo desde una vista dorsal, y las vesículas ópticas desde una vista frontal.

La activación de *foxd1* y la ausencia de *foxg1* en las células con actividad ectópica de Hh sugiere un cambio hacia identidad temporal de dichas células, a pesar de encontrarse posicionadas en la mitad dorsal del primordio de ojo que dará lugar posteriormente al dominio nasal de la retina (Fig. 16A-B). Para analizar si este cambio en el patrón de expresión de los marcadores NT tempranos conduce a un cambio de identidad en la retina diferenciada, analizamos en primer lugar si esta alteración de la expresión de *foxd1* y *foxg1* se mantiene a lo largo del desarrollo. En efecto, la expresión de *foxd1* se detecta en toda la capa ganglionar de la

retina a 6 días post-fertilización (Fig. 16C-D), indicando un mantenimiento de la expansión de identidad temporal en estadios larvarios. Posteriormente, analizamos la topología de las proyecciones retinotectales tiñendo con colorantes lipofílicos los axones de las CGR posicionadas en la mitad nasal y temporal de la retina, de manera independiente. En embriones control los axones de las CGR posicionadas en la mitad nasal proyectan en la región más posterior del tectum (el principal núcleo visual en zebrafish), mientras que las CGR ubicadas en el dominio temporal inervan la región anterior del tectum (Fig. 16E). Las proyecciones nasales de las retinas de los embriones *Tg{rx3::Gal4}; UAS:shh* inervan áreas más anteriores del tectum, solapando parcialmente con las proyecciones de las CGR de la mitad temporal de la retina (Fig. 16F).

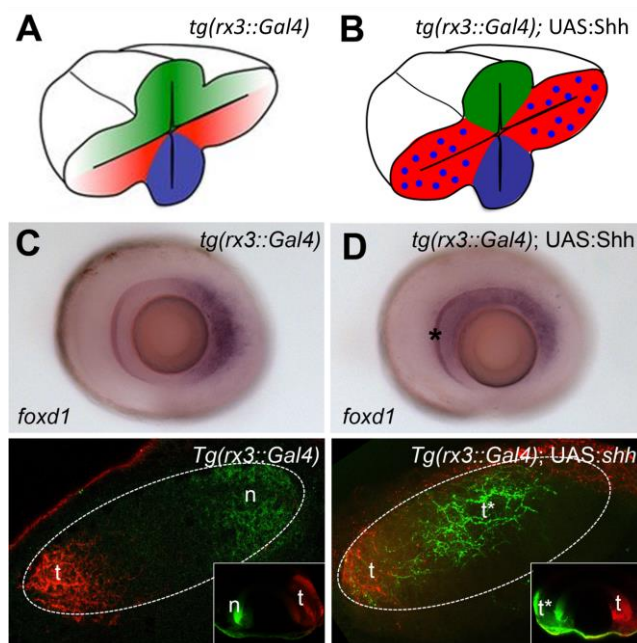


Figura 16. La expansión de la expresión de *foxd1* conlleva la adquisición de identidad temporal. Esquema de la expresión de *foxg1* (verde) y *foxd1* (rojo) desde una vista frontal en un embrión *Tg{rx3::gal4}* (A) y *Tg{rx3::gal4}; UAS:shh* con sobreexpresión ectópica de *shh* en las vesículas ópticas (B) a 10 ss. Expresión de *foxd1* en el ojo a 6 dpf en un embrión *Tg{rx3::gal4}* (C) y *Tg{rx3::gal4}; UAS:shh* (D). Vista dorsal del tectum y el ojo correspondiente de embriones de 6 dpf *Tg{rx3::gal4}* (E) y *Tg{rx3::gal4}; UAS:shh* (F) en los cuales se ha trazado con DiO/Dil las CGR en la región nasal (verde) y temporal (rojo) de la retina. Las líneas punteadas delimitan el tectum y el ojo correspondiente (anterior hacia la izquierda). Asterisco (*) indica la expansión de *foxd1*.

Estos resultados sugieren que las CGR posicionadas en la mitad nasal de la retina han adquirido identidad temporal cuando sus progenitores se han visto sometidos a una activación ectópica de la vía de Hh desde estadios muy tempranos en su desarrollo.

3. La señalización de Fgf no afecta a la actividad de Hh mientras que la señalización de Hh promueve la actividad de Fgf.

Estudios previos han demostrado el papel de la señalización de Fgf en la inducción de identidad nasal en la retina (Picker and Brand, 2005; Picker et al., 2009). La falta de actividad de la vía de Fgf en el primordio de ojo resulta en la ausencia de identidad nasal (Fig. 17A-B,Ñ-O) y la expansión de la identidad temporal a lo largo de la retina (Fig. 17C-D,Ñ-O). Por el contrario, la inhibición de la señalización de Hh en las vesículas ópticas conduce a una pérdida de identidad temporal que sin embargo no va acompañada de la expansión del dominio nasal (Fig. 12G-L), lo que sugiere la existencia de una posible regulación entre las vías de señalización de Hh y Fgf.

Para determinar si este es el caso, analizamos la expresión de *fgf8* y *spry4* en condiciones de falta de señalización de Shh, incubando los embriones con ciclopamina. Fgf8 es uno de los ligandos de la vía de señalización Fgf; *spry4* es un gen reportero de esta vía, regulado directamente por la señalización de la vía de Fgf actuando como inhibidor de la misma (Furthauer et al., 2001). Recíprocamente, examinamos la expresión de *shh*, *nkx2.1* y *ptch2* en embriones carentes de la actividad de Fgf realizando tratamientos farmacológicos con SU5402, un antagonista de la vía de Fgf (Mohammadi et al., 1997). *Shh* es el ligando de la vía de señalización de Hh expresado en la línea media ventral, mientras que *nkx2.1* y *ptch2* son genes directamente regulados por Hh que responden a bajas y altas concentraciones de ligando respectivamente (Hammond et al., 2010; Vokes et al., 2007).

Los resultados de estas manipulaciones indican que la actividad de Fgf no regula la señalización de Hh, mientras que la actividad de Hh sí controla positivamente la de Fgf. En condiciones de falta de actividad de Fgf no varían los niveles de expresión de *shh*, *nkx2.1* ni el transgénico *Tg{ptch2::kaede}* (Fig. 17E-J). Sin embargo, la falta de señalización de Hh conduce a la disminución de los niveles de expresión de componentes de la ruta de Fgf (Fig. 17K-N). Estos resultados sugieren que la actividad de Shh está promoviendo la expresión de *fgf8* en el telencéfalo, y la activación de la vía de Fgf en el telencéfalo y el primordio de ojo.

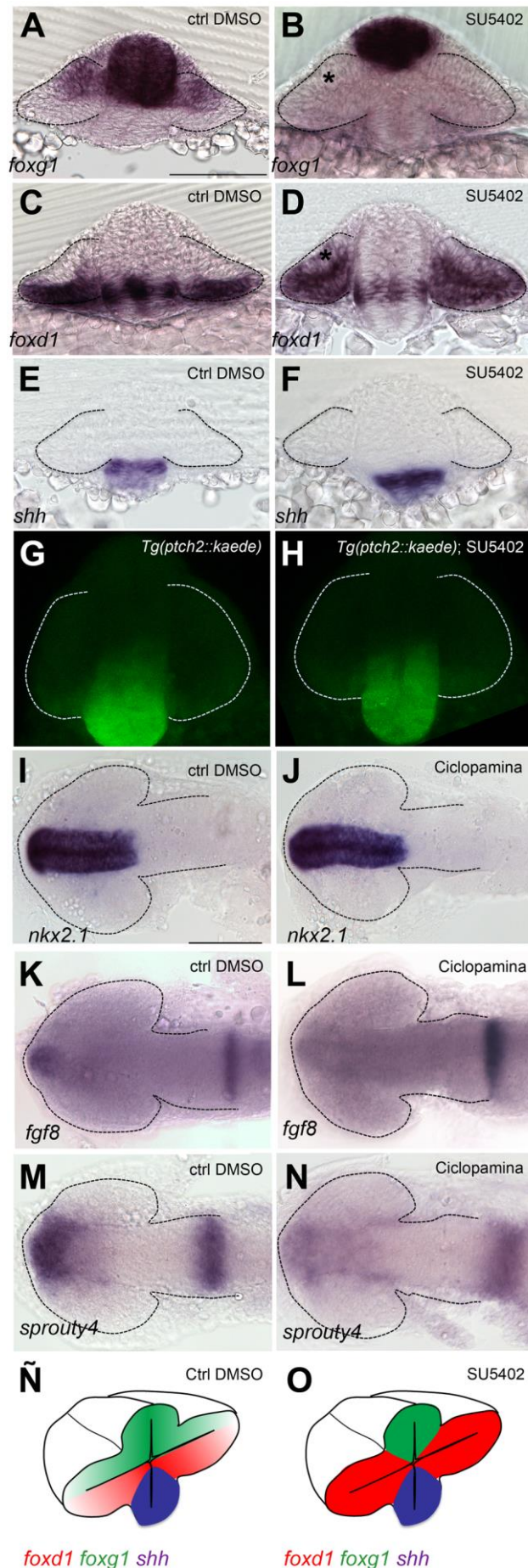


Figura 17. La falta de actividad de Fgf altera el patrón NT independientemente de Shh.

Vista frontal (A-H) y dorsal (I y J) de la expresión de *foxg1* (A y B), *foxd1* (C y D), *mab21/2* (E y F), *Tg{ptch2::kaede}* (G y H) y *nkx2.1* en embriones control (A, C, E e I) y *Tg{ptch2::kaede}* (G) tratados con DMSO, y en embriones tratados con SU5402 a partir de 1 ss (B, D, F, H e I). Vista dorsal de la expresión de *fgf8* y *sprouty4* en embriones control tratados con DMSO (K y M) y tratados con ciclopamina (L y N) a partir de 1 ss. Esquema de la expresión de *foxg1* (verde) y *foxd1* (rojo) desde una vista frontal en un embrión silvestre (Ñ) y tratado con ciclopamina (O). n=identidad nasal, t=identidad temporal, n*=carente de identidad nasal (B) y ganancia de identidad temporal (D). Las líneas punteadas delimitan el prosencéfalo desde una vista dorsal, y las vesículas ópticas desde una vista frontal.

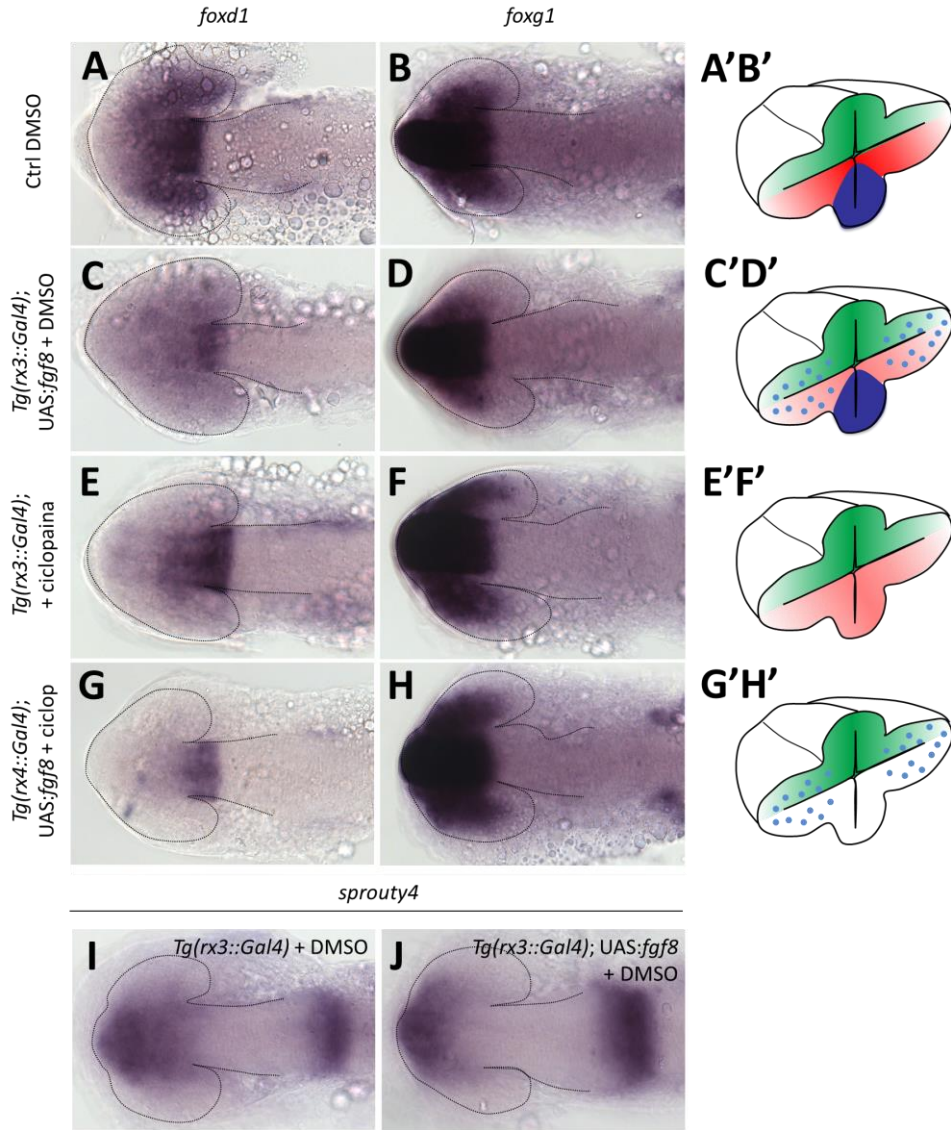
4. La señalización de Fgf no es suficiente para promover identidad nasal en toda la retina

La pérdida de actividad de Hh se acompaña de una reducción de la señalización de Fgf; a su vez, no se produce una expansión del marcador nasal *foxd1* al dominio ventral de las vesículas ópticas. La ausencia de la expansión de *foxd1* en estas condiciones puede deberse al hecho de que los bajos niveles de Fgf en el primordio de ojo no alcanzan el dominio ventral. Para comprobar la validez esta hipótesis, utilizamos de nuevo el sistema Gal4/UAS para sobreexpresar ectópicamente Fgf8 en todo el primordio de ojo. En estas condiciones, los niveles de expresión de *spry4* en el prosencéfalo aumentan (Fig. 18I-J), confirmando la eficacia de esta herramienta para activar la señalización de Fgf.

La activación ectópica de la señalización de Fgf en el primordio de ojo provoca una reducción parcial de la expresión de *foxd1* (Fig. 18A,C,A'). Sin embargo, esta manipulación experimental no causa la expansión de *foxd1* (Fig. 18B,D,B'). La ausencia de expansión de *foxd1* en estas condiciones de altos niveles de Fgf sugiere la existencia de una actividad inhibitoria en el dominio ventral sobre la expresión del marcador nasal. La actividad ventral de Hh podría ser suficiente para reprimir la expresión de *foxd1* en este dominio incluso en presencia de la señalización ectópica de Fgf.

Para determinar si Hh ejerce una actividad inhibitoria sobre la expresión de *foxd1*, eliminamos la actividad de Hh en condiciones en las que Fgf se expresa ectópicamente, tratando embriones *Tg{rx3::Gal4}; UAS:fgf8* con ciclopamina a partir de 1 ss. El análisis de expresión de los marcadores NT muestra una ausencia total de *foxd1* (Fig. 18G,G'), más acusada que la disminución observada en los tratamientos simples con ciclopamina o en embriones *Tg{rx3::Gal4}; UAS:fgf8* (Fig. 18E,E'). Sin embargo, la expresión de *foxd1* continúa restringida en el dominio dorsal (Fig. 18F,H,H'). Estos resultados sugieren la implicación de factores adicionales en la regionalización NT de la retina. Una posibilidad es que el propio Shh sea requerido en estadios previos a 1ss (estadio al que se ha realizado el tratamiento con ciclopamina) para reprimir *foxd1*.

Figura 18. La actividad de Fgf reprime la expresión de *foxd1*. Vista dorsal (A-J) de la expresión de *foxd1* (A, C, E y G), *foxd1* (B, D, F y H) y *sprouty4* (I y J) en embriones *Tg{rx3::gal4}* tratados con DMSO (A,B e I) y manipulados sobreexpresando *fgf8* en las vesículas ópticas y/o incubados con ciclopamina a partir de 1 ss según lo indicado en el panel de cada imagen (C-H y J). (A'-H') Esquemas de la expresión de *foxd1* (verde), *foxd1* (rojo), *fgf8* (azul) y *shh* (morado) en el prosencéfalo desde una vista frontal correspondientes a la condición de las imágenes posicionadas a su izquierda. Las líneas punteadas delimitan el prosencéfalo.



5. La eliminación simultánea de Fgf y Hh rescata parcialmente el patrón NT

Los resultados presentados hasta aquí indican que la señalización por Shh es necesaria y suficiente para la inducción de *foxd1* en el primordio de ojo y para el establecimiento de la región temporal de la retina. Así mismo, la actividad de Fgf es esencial para la expresión de *foxg1* y la especificación del territorio nasal en la mitad dorsal del campo de ojo. Teniendo en cuenta estas observaciones, cabría esperar que la ausencia simultánea de ambas vías de señalización condujese a la falta total de especificación NT de la retina. Para comprobar la validez de esta hipótesis, analizamos el patrón de expresión de *foxg1* y *foxd1* en embriones dobles mutantes para *fgf8* (*acerebellar; ace*) y *smoothened* (*smu*) y en embriones tratados simultáneamente con los antagonistas de ambas rutas, ciclopamina y SU5402.

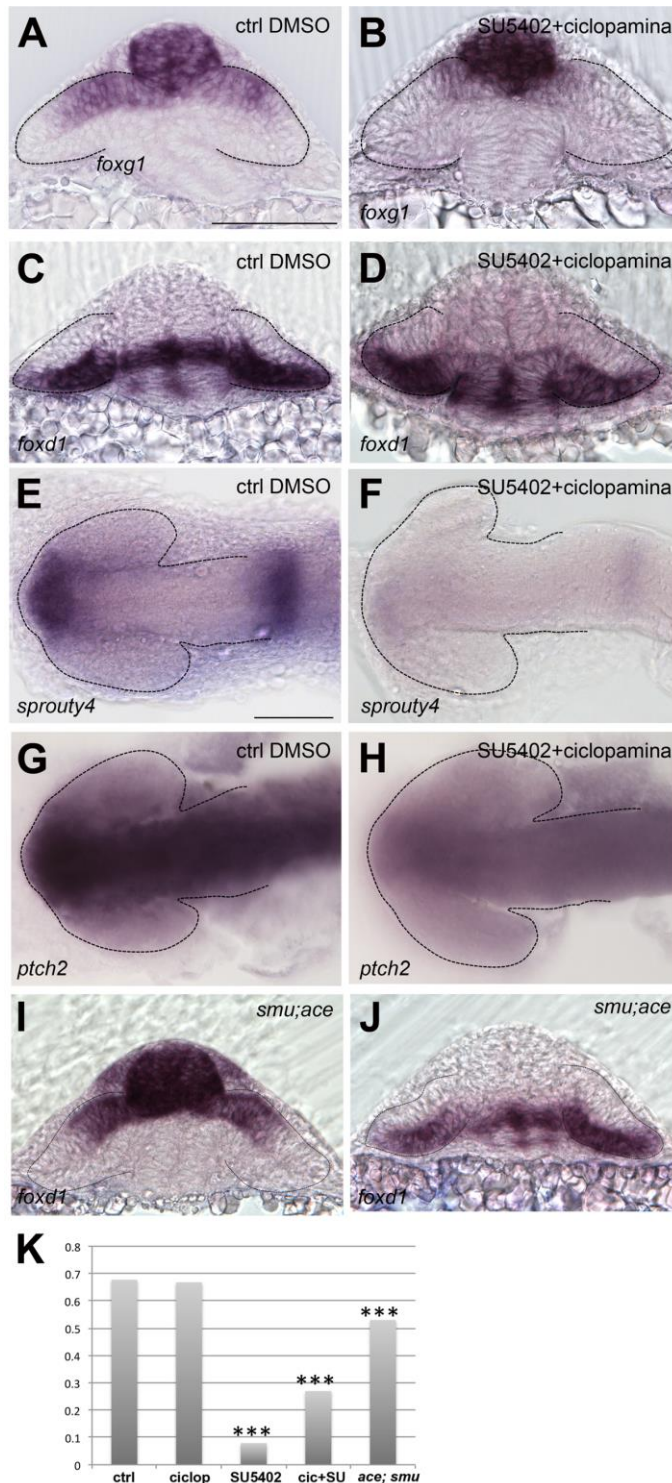


Figura 19. El balance entre la actividad de Fgf y Shh establece el patrón NT. Vista frontal (A-D, I y J) y dorsal (E-H) de la expresión de *foxg1* (A, B e I), *foxd1* (C, D y J) *sprouty 4* (E y F) y *ptch2* (G y H) en embriones control tratados con DMSO (A, C, E y G) y carentes de la señalización simultánea de Hh y Fgf mediante incubaciones con ciclopamina y SU5402 a partir de 1 ss (B, D, F y H) o en embriones *ace;smu* (I y J). (K) Tabla y gráfico con los datos de la cuantificación de la extensión de la expresión de *foxg1* en la mitad dorsal de las vesículas ópticas en las condiciones experimentales mostradas en esta figura. Las líneas punteadas delimitan el prosencéfalo desde una vista dorsal, y las vesículas ópticas desde una vista frontal.

Contrariamente a lo esperado, la eliminación conjunta de ambas vías de señalización produjo una recuperación parcial del patrón NT en las vesículas ópticas. Mientras que el tratamiento aislado con ciclopamina conlleva la ausencia de expresión de *foxd1* (Fig. 12G-H), su combinación con SU5402 resultó en el restablecimiento total de la expresión de *foxd1* en el dominio temporal de las vesículas ópticas (Fig. 19C-D). De igual manera, se observa una

recuperación parcial de identidad nasal como lo revela la expresión de *foxg1* en las células de las vesículas ópticas más próximas al telencéfalo (Fig. 19A-B).

La recuperación parcial del patrón NT en estas condiciones no se debe a una falta de eficacia del tratamiento, ya que la expresión de genes reporteros para Fgf y Hh, *spry4* y *ptch2*, se pierde totalmente tras los tratamientos con ciclopamina y SU5402 (Fig. 19E-H).

Los resultados obtenidos del análisis de los dobles mutantes *ace;smu* son similares a los observados en los tratamientos con ambas drogas. La expresión de *foxd1* en la mitad ventral de las vesículas ópticas se recupera totalmente (Fig. 19I), y la expresión de *foxg1* en la región nasal se recupera parcialmente (Fig. 19J). Esta recuperación es más completa que en el tratamiento con los inhibidores de las vías (Fig. 8K), probablemente reflejando el hecho de que los mutantes *ace* constituyen una falta parcial de actividad de Fgf, ya que sólo falta la función del ligando Fgf8.

En conjunto, estas observaciones indican que la pérdida simultánea de la actividad de Hh y Fgf compromete el establecimiento del patrón NT en menor medida que la manipulación individual de estas señales, y sugieren que la formación del patrón NT requiere el equilibrio correcto de ambas señales. La incompleta restauración de la expresión de *foxg1* en ausencia de ambas vías de señalización sugiere un papel más indispensable de la actividad de Fgf en la inducción de carácter nasal que de Hh en la adquisición de identidad temporal.

6. Niveles altos de actividad de las vías de señalización de Fgf y Hh no alteran el patrón NT

El hecho de que la eliminación simultánea de Fgf y Shh resulte en el restablecimiento parcial del patrón NT sugiere que la regionalización en nasal y temporal requiere un balance entre ambas vías de señalización. Para explorar más profundamente esta posibilidad, analizamos una situación en la cual ambas vías de señalización se encuentran activadas a altos niveles en la región anterior del embrión.

Astyanax mexicanus es un pez teleósteo autóctono de México que consta de dos variedades: una población que vive en ríos y lagos, y una población cuyo hábitat natural son las cuevas sumergidas, carentes de luz. Esta última variedad ha sufrido modificaciones morfológicas como consecuencia de su permanencia en hábitats carentes de luz natural, como son la ausencia de ojos y el incremento del hipotálamo (Menuet et al., 2007). Estos cambios se correlacionan a su vez con cambios en los patrones y niveles de expresión de una serie de genes esenciales para

el desarrollo temprano del prosencéfalo. Por ejemplo, los embriones de la variedad de las cuevas presentan un mayor nivel de señalización de Shh y una expresión precoz de *fgf8* en el telencéfalo en respuesta al exceso de Shh (Pottin et al., 2011). El exceso de señalización de Shh finalmente conduce a defectos en la retina y una mayor apoptosis en la lente lo que deriva en la degeneración ocular. A pesar de ello, la formación de las vesículas ópticas y su posterior invaginación para formar las copas ópticas no se ven afectadas en estos embriones (Menuet et al., 2007). Esto nos da la oportunidad de utilizar esta variedad de *Astyanax* para analizar el efecto de mayores niveles de Shh y Fgf8 sobre la regionalización del primordio de ojo. Razonamos que si Shh contrarresta el efecto de la actividad represora de Fgf sobre la expresión de *foxd1*, entonces mayores niveles de ambas señalizaciones no comprometerán de manera alguna el patrón NT de la retina.

El análisis de la expresión de los marcadores nasal y temporal en ambas variedades de *Astyanax mexicanus* confirma nuestras predicciones, ya que las vesículas ópticas de la variedad de la cueva muestra niveles similares de *foxg1* y *foxd1* comparados con los de la variedad de superficie (Fig. 20A-D).

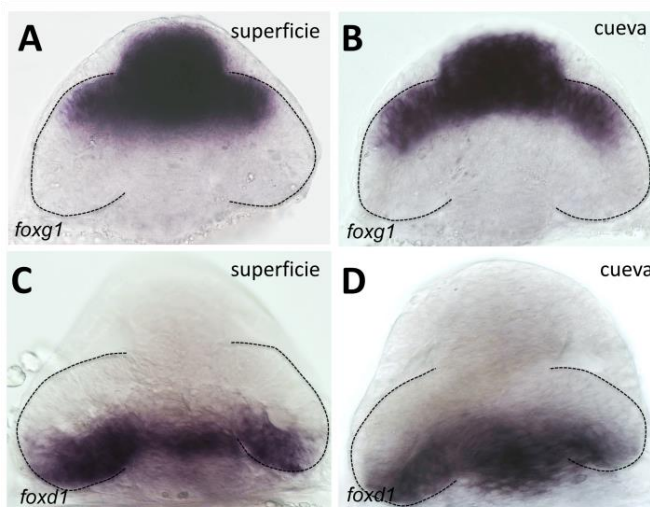


Figura 20. Niveles elevados de Fgf y Shh no alteran el patrón NT. Vista frontal de la expresión de *foxg1* (A y B) y *foxd1* (C y D) en la variedad de superficie (A y C) y de la cueva (B y D) de la especie *Astyanax mexicanus*. Las líneas punteadas delimitan el prosencéfalo desde una vista dorsal.

Estos resultados por tanto sugieren que el incremento simultáneo de la actividad de ambas vías de señalización no tiene efecto sobre la regionalización NT y son consistentes con un escenario en el cual la influencia de Shh y Fgf sobre el patrón NT depende del balance de niveles de actividad entre ambas vías.

7. La red regulatoria génica que establece el patrón NT de la retina actúa desde el inicio de la especificación del campo de ojo

La eliminación simultánea de la actividad de Fgf y Hh descrita más arriba se realizó tratando los embriones con ciclopamina y SU5402 a partir de un 1 ss, una vez establecido el primordio del ojo pero antes de la evaginación de las vesículas ópticas y del inicio de expresión de *foxd1* y *foxd1*, resultando en la recuperación parcial del patrón NT de la retina. Estos resultados sugieren que, o bien hay otros factores anteriores a 1 ss involucrados en la especificación de dichos territorios, o los Fgfs y Shh tienen una función anterior a 1 ss en la regionalización de eje NT. Para evaluar esta última hipótesis, analizamos el patrón de expresión de *foxd1* y *foxd1* al eliminar la actividad de Fgf y Hh mediante tratamientos con drogas desde 70% de epibolia. El análisis de la expresión del marcador telencefálico en la línea transgénica *Tg(emx3::YFP)*, y del marcador de campo de ojo e hipotálamo en embriones *Tg(rx3::GFP)* confirma que tanto la falta de Fgf como de Hh desde 70% epibolia no afecta al establecimiento de los territorios primarios del prosencéfalo (Fig. 21E-J).

En esta condición experimental observamos una ausencia completa de la expresión de *foxd1* (Fig. 21A,C), acompañada de la expansión de la expresión de *foxd1* a todo el primordio del ojo (Fig. 21B,D). Este mismo fenotipo se obtiene en los tratamientos individuales con SU5402 (Fig. 17B,D), y sugiere que la actividad de Hh es prescindible para la inducción de *foxd1* en ausencia de la señalización de Fgf.

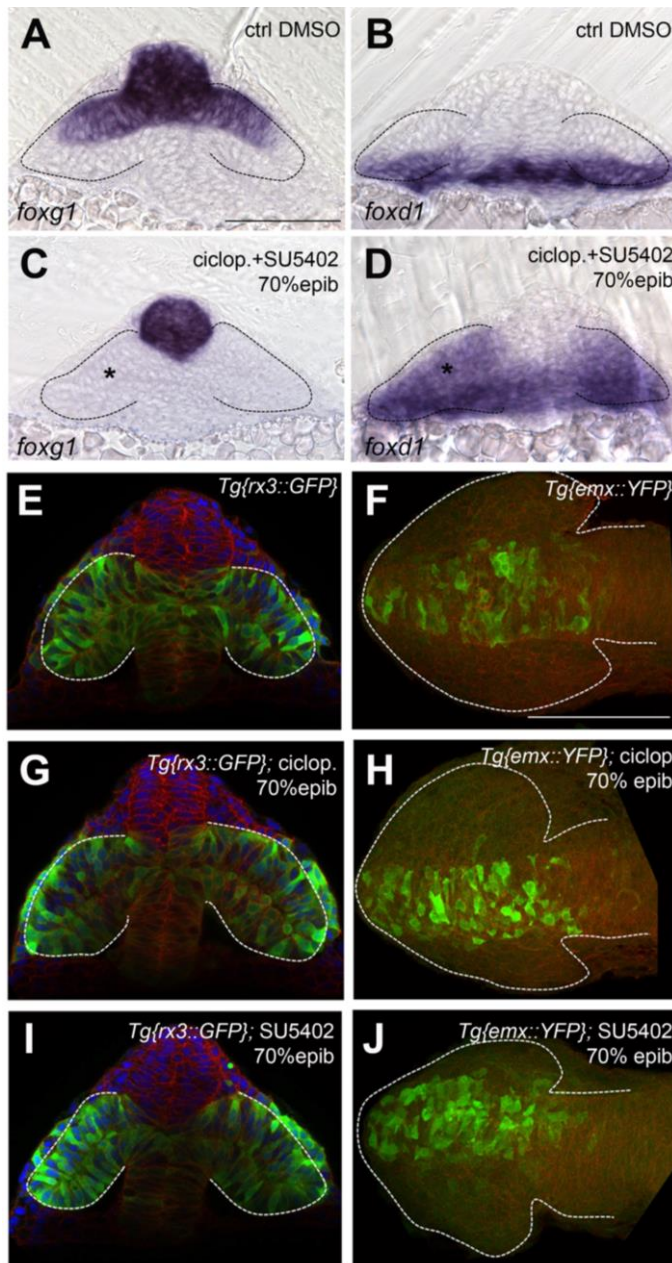


Figura 21. Shh es prescindible para la expresión de *foxd1* en ausencia de Fgf. Vista frontal de la expresión de *foxg1* (A y C) y *foxd1* (B y D) en embriones control tratados con DMSO (A y C) y carentes de la señalización simultánea de Hh y Fgf mediante incubaciones con ciclopamina y SU5402 a partir de 70% epibolia (B y D). Vista frontal (E, G e I) y dorsal (F, H y J) de las líneas transgénicas *Tg(rx3::GFP)* (E, G e I) y *Tg(emx::YFP)* (F, H y J) en embriones control tratados con DMSO (E y F) y en embriones tratados con ciclopamina (G y H) y SU5402 (I y J) desde 70% epibolia. En estas condiciones no se observan cambios en las subdivisiones primarias del cerebro. Las líneas punteadas delimitan el prosencéfalo desde una vista dorsal, y las vesículas ópticas desde una vista frontal.

8. La vía de señalización de Nodal no es determinante para la expresión de *foxd1* y la especificación temporal de la retina

Los resultados descritos en el apartado anterior sugieren que otro mecanismo debe actuar en paralelo a Hh para inducir *foxd1*. Dado que la expresión de *foxd1* en ausencia de Hh y Fgf está expandida a la totalidad del primordio de ojo, este potencial regulador debe tratarse o bien de un factor de transcripción presente en todo este dominio, o bien de una vía de señalización cuya fuente de expresión se encuentre adyacente al mismo.

Los ligandos de la vía de señalización de Nodal se expresan en la línea media ventral del tubo neural anterior, adyacente a la mitad ventral del primordio de ojo. Su actividad es necesaria para la especificación del hipotálamo y la expresión de Shh en esta región del tubo neural (Rohr et al., 2001). Por ello nos planteamos la posibilidad de que Nodal y Hh cooperaran en la especificación de la identidad temporal de la retina.

Para testar esta hipótesis, analizamos la expresión de *foxd1* en los mutantes *one-eyed pinhead* (*oep*), mutante en la proteína EGF-CFC esencial para la señalización de Nodal, y *cyclops* (*cyc*), mutante en uno de los ligandos de la ruta de Nodal. Ambas condiciones mutantes resultan en una falta de función de la ruta de Nodal (Gritsman et al., 1999; Hatta et al., 1991). Los embriones *oep* y *cyc* tienen defectos en la especificación de estructuras mediales del tubo neural anterior, lo que afecta a la correcta especificación del tallo óptico, pero la porción distal de las vesículas ópticas se forma correctamente.

La expresión de *foxd1* está ausente en *oep* y *cyclops* (Fig. 22A,C,E), mientras que *foxd1* se expresa de manera normal (Fig. 22B,D,F). Dado que Nodal induce la expresión de Shh en la porción ventral del tubo neural anterior, el fenotipo observado podría deberse a la ausencia de Shh en estas condiciones. Con el fin de determinar si esto es así, procedimos a inhibir la actividad de Nodal de manera restringida en el tiempo, realizando tratamientos farmacológicos desde 70% epibolia con el compuesto SB431542, que actúa como un antagonista del receptor de Nodal TGF β 1 (Inman et al., 2002).

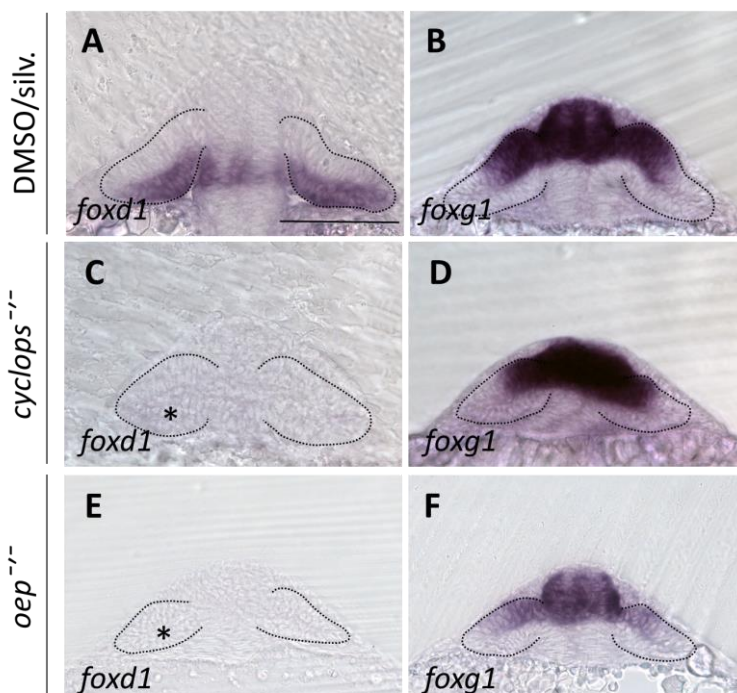


Figura 22. Mutantes para la vía de Nodal conllevan la pérdida de *foxd1*. Vista frontal de la expresión de *foxd1* (A, C y E), *foxd1* (B, D y F) y embriones control (A y B) y homocigotos *cyclops* (C y D) y *oep* (E y F). Los asteriscos (*) indican la ausencia de expresión de *foxd1* en el dominio ventral de las vesículas ópticas. Las líneas punteadas delimitan las vesículas ópticas.

Al contrario de lo que observamos en embriones *oep* y *cyclops*, la expresión de *foxd1* en los embriones tratados con SB431542 está sólo levemente reducida (Fig. 23A). Puesto que la actividad de Nodal regula la señalización de Hh, analizamos el ligando Shh y los genes indicadores de la activación de la vía de Shh *nkx2.1* y *ptch2* en esta condición experimental. Observamos que aunque la expresión de Shh permanece casi inalterada (Fig. 23K-L), es suficiente para producir una disminución en su señalización, como así lo indican los menores niveles de expresión de los genes analizados (Fig. 23M-O). Este hecho explicaría la leve bajada en los niveles de *foxd1* observados en estas condiciones, aunque no descarta un requerimiento directo de Nodal como regulador de la expresión de *foxd1*.

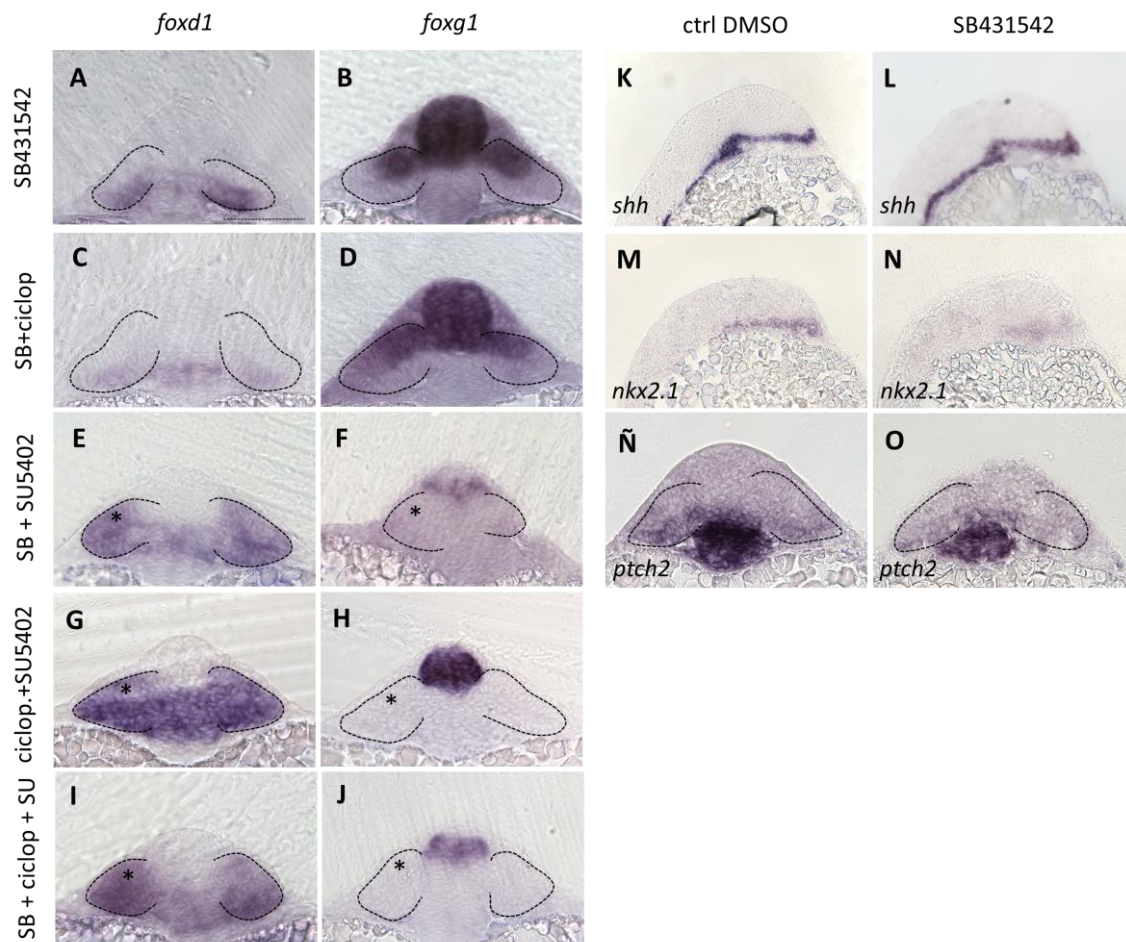


Figura 23. La actividad de Nodal no es esencial para la expresión de *foxd1*. Vista frontal (A-K, Ñ y O) y lateral (K-N), con anterior hacia la derecha, de la expresión de *foxd1* (A, C, E, G e I), *foxg1* (B, D, F, H y J), *shh* (K y L), *nkx2.1* (M y N) y *ptch2* (Ñ y O) en embriones tratados con los inhibidores indicados en la figura. Los asteriscos (*) indican la expresión ectópica de *foxd1* (E, G e I) o la ausencia de expresión de *foxg1* (F, H y J). Las líneas punteadas delimitan las vesículas ópticas.

Para profundizar en la posible regulación de la expresión de *foxd1* por parte de la vía de señalización de Nodal, realizamos ratamientos farmacológicos combinados para eliminar simultáneamente la actividad de Hh, Fgf y Nodal en el embrión. Embriones incubados con ciclopamina y SB431542 (falta simultánea de Hh y Nodal) muestran una acusada reducción en la expresión de *foxd1* (Fig. 23C), fenotipo similar al obtenido sólo con ciclopamina (Fig. 12G-H). Esto sugiere que Nodal no tiene un efecto aditivo a Hh. Por otro lado, embriones incubados con SU5402 y SB431542 (falta simultánea de Fgf y Nodal) presentan una expansión de *foxd1* por toda la vesícula óptica (Fig. 23E), reproduciendo el fenotipo de la falta individual de Fgf (Fig. 17D). Este resultado sugiere que la inducción de la expresión de *foxd1* en estas condiciones no es debida a la señalización por Nodal. Finalmente, para descartar un posible efecto compensatorio entre las vías de señalización de Fgf, Hh y Nodal en la regionalización del eje NT en el primordio de ojo, procedimos a inhibir la función de las tres simultáneamente (mediante incubación simultánea con las tres drogas), obteniendo un fenotipo comparable al de la falta de función de Fgf y Hh (Fig. 23G-J).

Teniendo en consideración todos los resultados, podemos afirmar que la señalización de Nodal probablemente afecta a la expresión de *foxd1* de manera indirecta, a través de su regulación de la expresión de Shh.

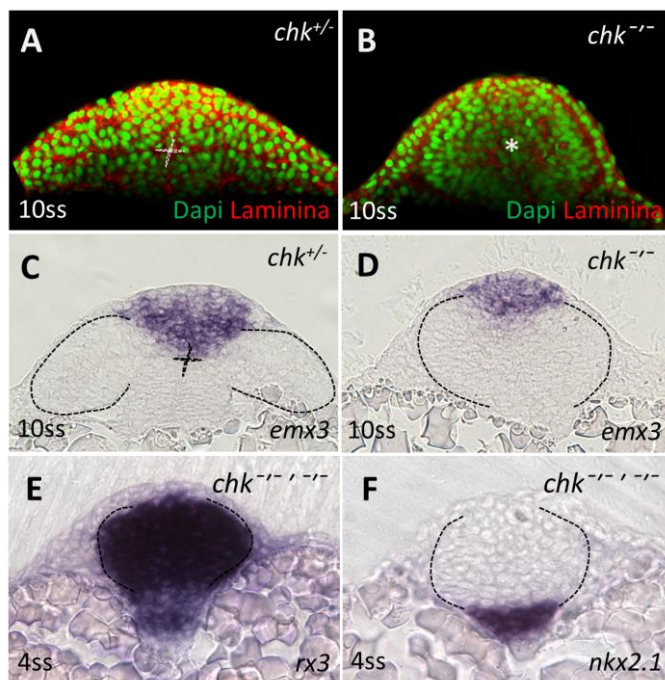
9. Rx3 promueve la expresión de *foxd1* en el campo de ojo de manera autónoma celular

Rx3 es uno de los factores de transcripción necesarios para la morfogénesis y especificación completa del campo de ojo (Loosli et al., 2001). Su expresión comienza a mitad de gastrulación, en la porción anterior del neuroectodermo, donde regula la expresión de otros genes necesarios para promover una correcta especificación del ojo y activa un programa morfogenético que conduce a la evaginación de las vesículas ópticas (Chuang and Raymond, 2001; Kennedy et al., 2004; Loosli et al., 2001).

La falta de función de Rx3 en los mutantes *chokh* (*chk*) conlleva que las células del campo de ojo no sufran su evaginación lateral, por lo que permanecen agrupadas en la línea media (Fig. 24A-B); además, puesto que carecen de *rx3* funcional, no activan la expresión de los sucesivos determinantes de identidad de ojo (Kennedy et al., 2004). Sin embargo, esta falta de función no interfiere con la especificación inicial del campo de ojo (Loosli et al., 2003; Loosli et al., 2001), como se refleja en el hecho de que *rx3* presenta un patrón de expresión normal en los embriones

homocigotos a estadio de 4 ss (Fig. 24E). El análisis de *emx3* y *nkx2.1*, marcadores de identidad telencefálica e hipotalámica respectivamente, muestran que si bien estos dominios están levemente alterados en los mutantes *chk*, su disposición relativa al campo de ojo es normal (Fig. 24C-D,F). Al tratarse de un alelo recesivo, los embriones heterocigotos *chk*^{+/-} no muestran fenotipo mutante, valiéndonos como control del fenotipo silvestre. Dado que la expresión de *rx3* está presente en la totalidad del campo de ojo desde el inicio de su especificación, y su patrón de expresión coincide con el de *foxd1* en ausencia de la señalización de Fgf y Hh, razonamos que se trata de un buen candidato para conferir competencia al campo de ojo para expresar *foxd1*. Esta idea se ve apoyada por la existencia de sitios de unión potenciales para Rx3 en el promotor de *foxd1* (Yin et al., 2014). Para determinar si *rx3* está involucrado en controlar la expresión de *foxd1*, analizamos la expresión de este gen en los mutantes *chk*.

Figura 24. La falta de Rx3 no compromete la especificación del campo de ojo. Vista frontal del

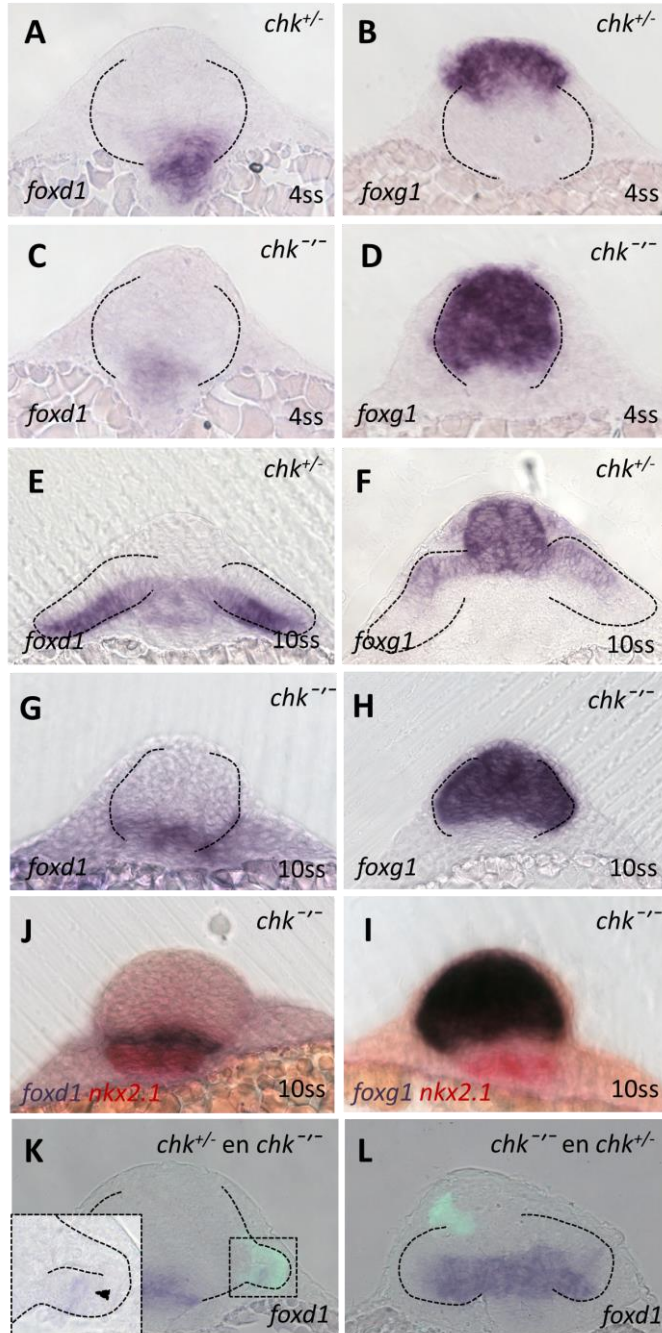


prosencefalo de un embrión control (A) y *chk*^{-/-} (B) a 10 ss teñidos mediante inmunofluorescencia con β -catenina y marcaje de los núcleos con Dapi. Vista frontal de la expresión de *emx3* a 10 ss en un embrión control (C) y *chk*^{-/-} (D). Vista frontal de la expresión de *rx3* (E) y *nkx2.1* (F). No se observan diferencias en el patrón de expresión de *rx3* y *nkx2.1* entre embriones control y embriones *chk*^{-/-}. Las líneas delimitan las vesículas ópticas en los embriones control y el primordio de ojo en los embriones *chk*^{-/-}.

Los mutantes *chk* presentan una reducción acusada de los niveles de *foxd1*, que queda restringido a la porción más ventral del primordio de ojo (Fig. 25C,G). De manera recíproca, *foxd1* se expande a la mayor parte del dominio de ojo (Fig. 25D,H). Estos cambios son evidentes ya a 4 ss (Fig. 25-D), el estadio más temprano al cual podemos detectar la expresión de *foxd1* y *foxd1* en el primordio de ojo, y se mantienen hasta estadio de 10 ss (Fig. 25E-H), momento en el cual las vesículas ópticas han evaginado completamente en los embriones silvestres. Confirmamos que estos cambios en la reducción de la expresión *foxd1* y extensión de *foxd1* se producen dentro del territorio del

campo de ojo, comparando sus dominios de expresión con el de *nkx2.1*, expresado en hipotálamo (Fig. 25I-J).

Figura 25. Rx3 induce la expresión de *foxd1* de manera autónoma celular. Vista frontal de la expresión



de *foxd1* (A, C, E y G) y *foxg1* (B, D, F y H) en embriones control (A, B, E y F) y *chk*^{-/-} (C, B, G y H) a estadio de 4 ss (A-D) y 10 ss (E-H). Expresión de *nkx2.1* (rojo) y *foxd1* (I) o *foxg1* (I) en embriones *chk*^{-/-} a 10 ss. Vista frontal de la expresión de *foxd1* en un embriones *chk*^{-/-} (K) y control (L) con células trasplantadas en el primordio de ojo desde un embrión control y *chk*^{-/-}, respectivamente. El recuadro muestra en aumento el rescate de la expresión de *foxd1* en las células trasplantadas (K). Las líneas delimitan las vesículas ópticas en los embriones silvestres y el primordio de ojo en los embriones *chk*^{-/-}.

Los resultados anteriores

sugieren que Rx3 controla, directa o indirectamente, la expresión de *foxd1* en el primordio del ojo. Para comprobar si Rx3 regula de manera directa la expresión de *foxd1*, realizamos trasplantes de células procedentes de embriones silvestres en embriones receptores mutantes para *rx3*, en el territorio que dará lugar al futuro campo de ojo. Las células trasplantadas se

integran en el campo de ojo del embrión receptor y evaginan lateralmente generando una estructura similar a una pequeña vesícula óptica (Fig. 25K), indicando que las células silvestres son capaces de organizarse morfogénicamente como en un embrión control, dando lugar a las vesículas. Las células trasplantadas muestran expresión de *foxd1* cuando están situadas en la mitad ventral, futuro dominio temporal, del primordio del ojo (Fig. 25K). Trasplantes de células *chk* en embriones silvestres, por el contrario, tienen como resultado la segregación en todos los casos de las células trasplantadas a la mitad dorsal de la vesícula óptica (Fig. 25L), región carente de expresión de *foxd1*. Nuestros resultados sugieren por tanto una regulación directa de la expresión de *foxd1* en el primordio de ojo por parte de Rx3.

10. Rx3 no modula la actividad de la señalización de Fgf y Shh.

Los resultados presentados en el apartado anterior indican que Rx3 induce, probablemente de manera directa, la expresión de *foxd1* en el primordio del ojo. Sin embargo, no se puede descartar que Rx3 también module la actividad de Hh y Fgf en el embrión. Para determinar si esta modulación existe, analizamos los patrones de expresión de marcadores de actividad de Hh y Fgf en mutantes *chk*^{-/-}.

Los niveles de actividad de la vía de señalización de Fgf son comparables en embriones *chk* y embriones silvestres. Aunque la expresión telencefálica de *fgf8* está expandida en el eje AP de los embriones *chk*, sus niveles de expresión son similares a los detectados en embriones control (Fig. 26A-B); además, los niveles de expresión de *pea3* y *erm* son similares en embriones *chk* y embriones control (Fig. 26C-F). De manera similar, no detectamos cambios significativos en los niveles de activación de la vía de Hh. La expresión hipotalámica de *shh* presenta niveles inferiores, sobre todo en la región más anterior (Fig. 26G-H); aun así no parece afectar al nivel de su actividad en el hipotálamo ya que la expresión del determinante hipotalámico *nkx2.1* es similar en embriones control y *chk* a 4 ss (Fig. 24F), y la expresión de *ptch2* y *gli1* en el primordio del ojo se encuentra restringida a la mitad ventral del mismo a 10 ss (Fig. 26I-L). Concluimos por tanto que el fenotipo observado en la falta de función de *rx3* no se debe a una potencial modulación de la actividad de las vías de Fgf y Hh.

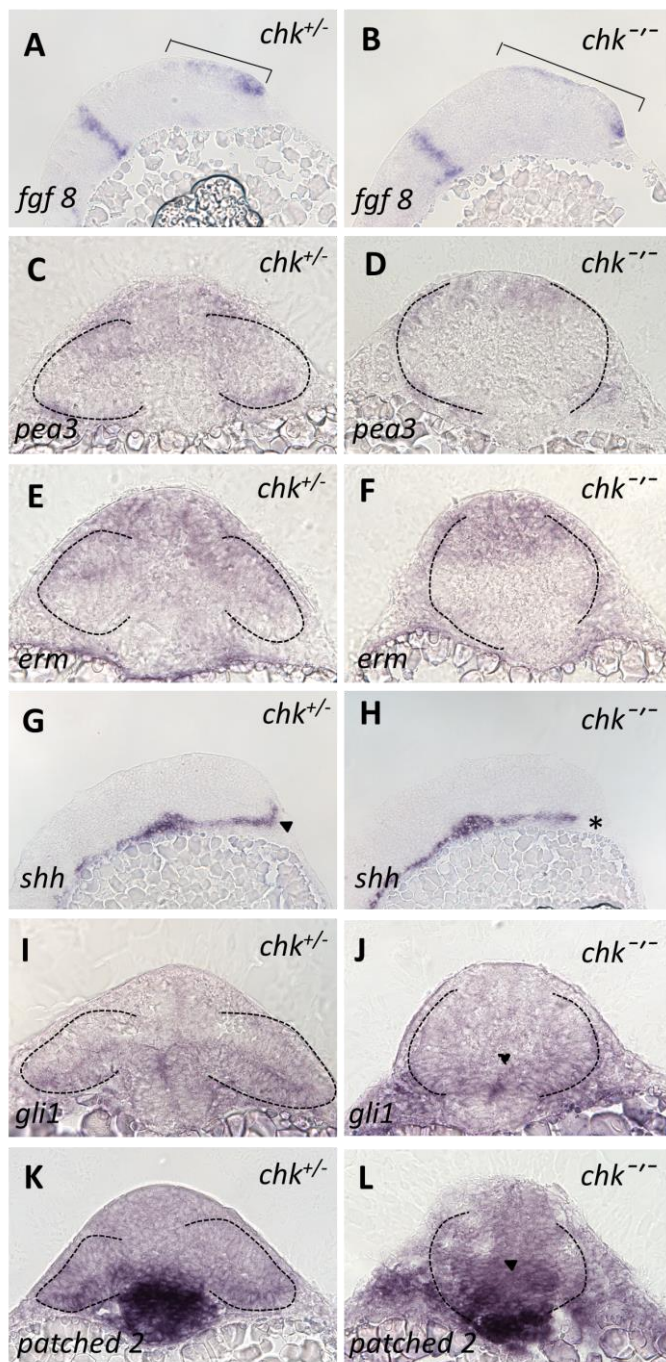


Figura 26. La actividad de Fgf y Shh es independiente de Rx3. Vista lateral (A y B) y frontal (C-L) de la expresión de *fgf8* (A y B), *pea3* (C y D), *erm* (E y F), *shh* (G y H), *gli1* (I y J) y *ptch2* (K y L) en embriones control (A, C, E, G, H y K) y en embriones *chk*^{-/-} (B, D, F, H, J y L). La barra muestra la extensión de la expresión de *fgf8* en el telencéfalo (A y B). La flecha marca la expresión de *shh* en el prosencéfalo anterior en embriones control (G) y el asterisco (*) señala la pérdida de esta expresión en embriones *chk*^{-/-}. La flecha marca el límite DV de la expresión de *gli1* (J) y *ptch2* (L) en el primordio de ojo en embriones *chk*^{-/-}. Las líneas punteadas delimitan las vesículas ópticas en los embriones control y el primordio de ojo en los embriones *chk*^{-/-}.

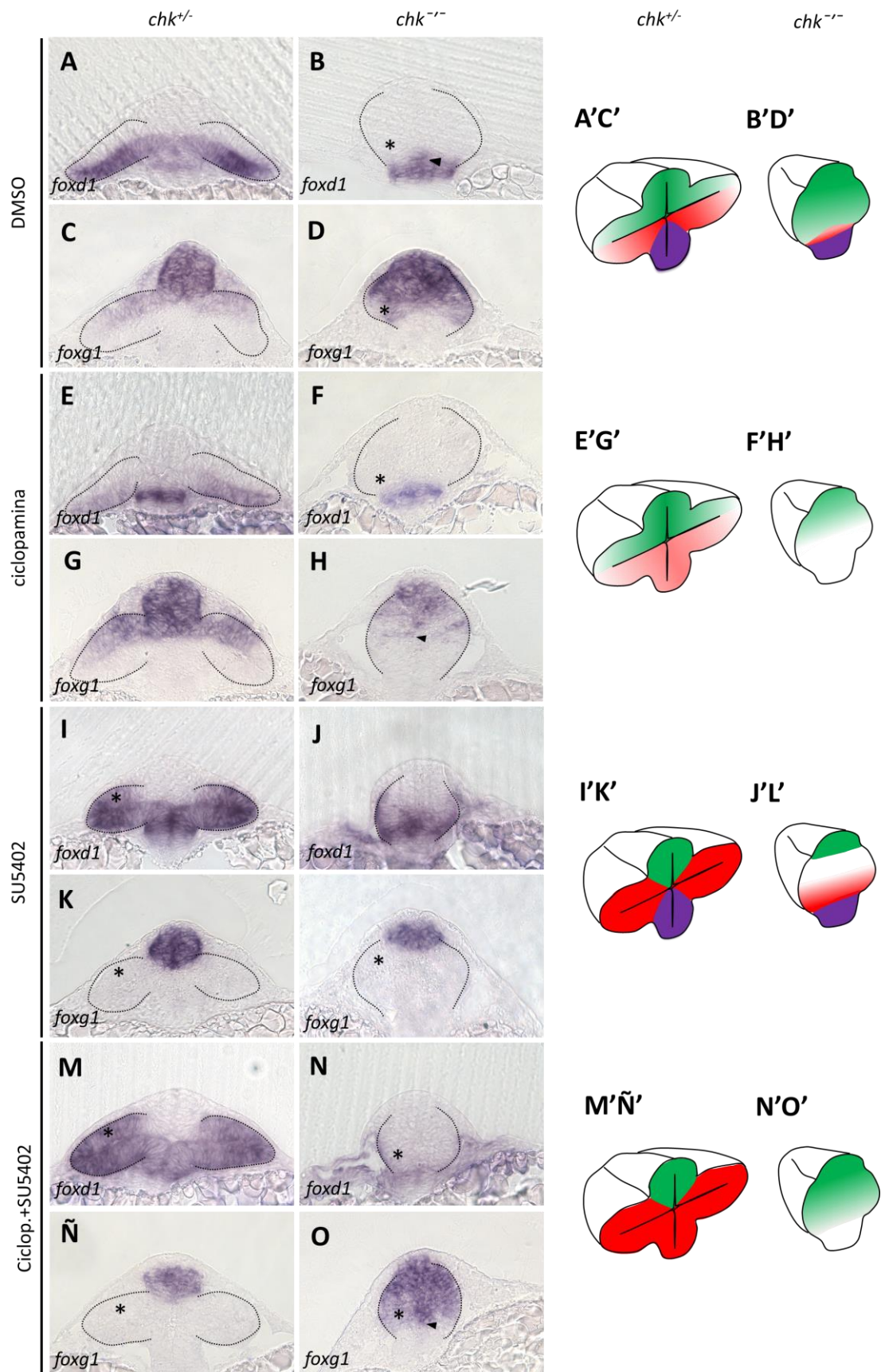
11. Shh y Rx3 cooperan para promover la expresión de *foxd1* en la porción ventral del primordio de ojo

Los resultados mostrados hasta el momento son compatibles con una situación en la cual Rx3 presente en todo el campo de ojo conferiría competencia a este territorio para expresar *foxd1*. La actividad de Fgf en la región dorsal de este dominio induciría la expresión de *foxd1* y reprimiría *foxd1*, mientras que la actividad de Shh reforzaría la expresión de *foxd1* en el dominio ventral, evitando así su represión por parte de Fgf, y refinando la subdivisión en nasal y temporal en las

vesículas ópticas. En un escenario de este tipo, cabría esperar que la falta de función simultánea de Rx3 y Shh resultase en la ausencia total de expresión de *foxd1*. A su vez, en esta situación carente de Foxd1, la actividad de Fgf no debería tener ningún efecto adicional sobre la expresión del determinante temporal. Para comprobar la validez de estas predicciones, analizamos la expresión de *foxd1* en embriones *chk* tratados con ciclopamina para eliminar la función de Shh, o con ciclopamina y SU5402 para eliminar la función tanto de Shh como de Fgfs.

La falta de función simultánea de la actividad de Rx3 y Shh en embriones *chk* tratados con ciclopamina resulta en la ausencia total de expresión de *foxd1* (Fig. 27F), un fenotipo más acusado de lo observado en ausencia de Rx3 o Shh por separado (Fig. 27B,E). El mismo fenotipo de falta de *foxd1* se observa en la deficiencia simultánea de la actividad de Rx3, Shh y Fgf (mediante tratamientos dobles con ciclopamina y SU5402 en embriones *chk*) (Fig. 27N). Estos resultados confirman nuestra predicción, y son consistentes con la idea de que Shh y Rx3 cooperan en la inducción de *foxd1*.

Figura 27. Rx3 y Shh cooperan para promover la expresión de *foxd1*. Vista frontal de la expresión de *foxd1* (A, B, E, F, I, J, M y N) y *foxg1* (C, D, G, H, K, L, Ñ y O) en embriones control (A, C, E, G, I, K, M y Ñ) y *chk*^{-/-} (B, D, F, H, J, L, N y O) tratados con DMSO (A-D) o con los inhibidores indicados en la figura. Esquemas de la expresión de *foxg1* (verde), *foxd1* (rojo) y *shh* (morado) en el prosencéfalo desde una vista frontal correspondientes a la condición de las imágenes posicionadas a su izquierda (A'-O'). Los asteriscos (*) indican la expresión ectópica de *foxd1* (I y M) y *foxg1* (D y O) o la ausencia de expresión de *foxd1* (B, F y N) y *foxg1* (K, L y Ñ). Las flechas marcan el límite DV de la expresión de *foxg1* (H y O). indican ,e I) o la ausencia de expresión de *foxg1* (F, H y J). Las líneas punteadas delimitan las vesículas ópticas en los embriones control y el primordio de ojo en los embriones *chk*^{-/-}.



Además de analizar *foxd1*, analizamos la expresión de *foxg1* en estas condiciones. Los embriones *chk* muestran una expansión de *foxg1* (Fig. 27C-D), que cubre casi en su totalidad el campo de ojo. Al igual que lo observado en embriones silvestres, tratamientos con SU5402 sobre embriones *chk* resultan en la pérdida total de expresión de *foxg1* en el campo de ojo (Fig. 27L). Por otro lado, embriones *chk* tratados con ciclopamina muestran una reducción leve de *foxg1* (Fig. 27H), probablemente porque la falta de actividad de Hh conlleva una reducción de los niveles de Fgf. Sorprendentemente, embriones *chk* tratados simultáneamente con ciclopamina y SU5402 aún presentan expansión de *foxg1* en el primordio del ojo (Fig. 27O). Este resultado sugiere que la expresión de *foxg1* no requiere únicamente la señalización de Fgf, sino que factores adicionales contribuyen a ello.

12. La represión mutua entre Foxg1 y Foxd1 restringe y mantiene el borde entre los dominios nasal y temporal

El patrón de expresión de *foxg1* y *foxd1* está altamente conservado en vertebrados. Estudios previos en pollo y ratón han demostrado una represión mutua entre ambos factores de transcripción (Huh et al., 1999; Takahashi et al., 2009; Takahashi et al., 2003). Para comprobar si esto ocurre también en la retina del pez cebra, manipulamos experimentalmente los niveles de *foxg1* y *foxd1* en el primordio del ojo. Para ello generamos los vectores UAS:*foxg1* y UAS:*foxd1* y recurrimos a la línea transgénica *Tg(rx3::gal4)*. La expresión ectópica de *foxg1* en el dominio ventral de las vesículas ópticas reprime fuertemente la expresión de *foxd1* (Fig. 28A-B). De manera recíproca, la expresión ectópica de *foxd1* en el territorio dorsal inhibe la expresión de *foxg1* (Fig. 28C-D). En ambos casos el efecto es autónomo celular, observándose un parcheado de expresión coincidente con el mosaicismo de activación del gen reportero GFP en la línea transgénica *Tg(rx3::gal4)* (no mostrado).

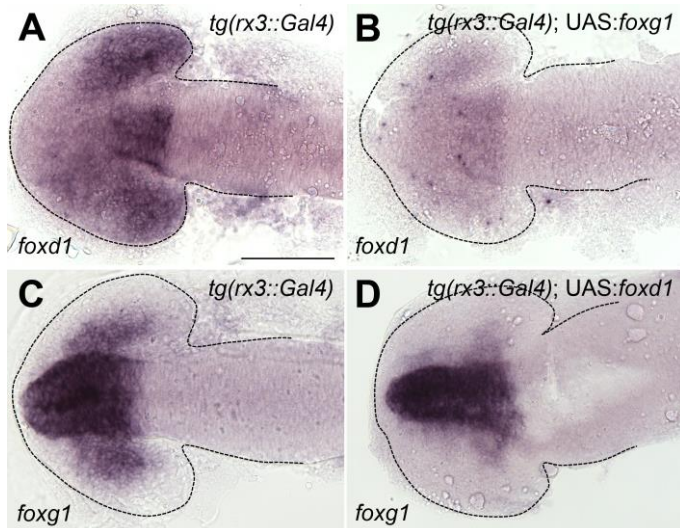


Figura 28. Foxg1 y Foxd1 se reprimen mutuamente en el primordio de ojo. Vista dorsal de la expresión de *foxd1* (A y B) y *foxg1* (C y D) en embriones *Tg{rx3::gal4}* (A y C) y *Tg{rx3::gal4}; UAS:foxg1/foxd1* con sobreexpresión ectópica de *foxg1* y *foxd1*, respectivamente, en las vesículas ópticas. Las líneas punteadas delimitan las el prosencéfalo.

Asimismo, analizamos el patrón de expresión de *foxg1* y *foxd1* en los mutantes para ambos factores de transcripción. El mutante de *foxg1* fue generado y cedido por el laboratorio de la Prof. Corinne Houart; el mutante de *foxd1* en pez cebra no existía y por ello lo generamos para llevar a cabo este análisis. El alelo generado presenta una delección de 10 pares de bases que conlleva a la aparición de un codón de parada prematuro en el aminoácido 70 (Fig. 29A), antes del dominio de unión a ADN, lo que genera una proteína truncada no funcional (Fig. 29B). El análisis de la expresión de la molécula de membrana *rtk2*, cuya expresión está regulada por Foxd1 (Takahashi et al., 2009), y de *epha5a*, regulada por Foxg1 (Takahashi et al., 2003), revela una reducción de *rtk2* muy significativa en la mitad temporal (Fig. 29C,E), a la vez que la expresión de *epha5a* se expande a toda la retina (Fig. 29D,F). Estos resultados confirman que en ausencia de Foxd1 funcional el dominio temporal no se especifica.

La expresión de *foxd1* en los mutantes de *foxg1* se ve expandida al dominio nasal de la retina (Fig. 29I,J), mientras que los niveles de *foxg1* están reducidos a las 48 hpf (Fig. 29G,H). De manera recíproca, la expresión de *foxg1* se expande a toda la retina en el mutante de *foxd1* (Fig. 29L,N). La expresión de *foxd1* en estos mutantes es menor que en el control a 48 hpf (Fig. 29Ñ-O), y está totalmente ausente a 5 días post fertilización (Fig. 29Q). Estos resultados son consistentes con una represión recíproca entre *foxd1* y *foxg1* en peces al igual que en otros vertebrados.

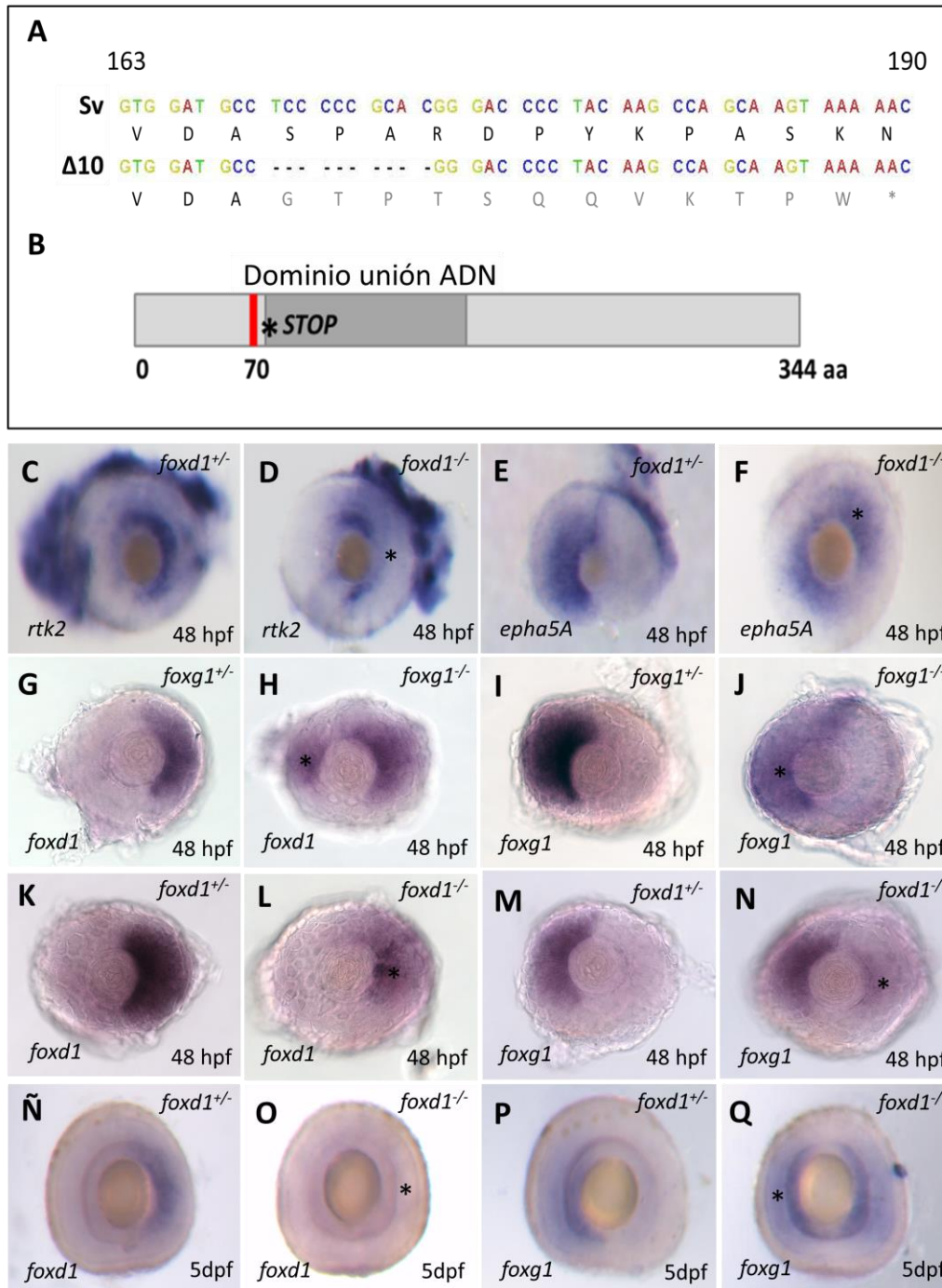


Figura 29. La represión recíproca entre Foxg1 y Foxd1 mantiene la subdivisión NT. (A) Secuencia del ADN desde el nucleótido 163 al 190 después del ATG inicial en el pez cebra control (Sv) y mutante para *foxd1* con una delección de 10 pares de bases desde el nucleótido 172 al 181. Se observa que se produce un cambio de lectura, modificándose la secuencia de aminoácidos que conlleva a la aparición de un codón de parada prematuro. (B) Representación gráfica de los dominios del factor de transcripción Foxd1. La mutación en la cadena de ADN conlleva a la aparición de un codón de parada prematuro en la posición 70 de la proteína, formándose una proteína truncada antes del dominio de unión al ADN, y originándose por tanto una proteína no funcional. (C-Q) Vistal lateral (nasal hacia la izquierda y temporal hacia la derecha) de ojos a 48 hpf (C-L, Ñ y O) y a 6 dpf (M, N, P y Q). Expresión de *rtk2* (C y E) y *epha5A* (D y F) en embriones control (C y D) y *foxd1*^{-/-} (E y F). Expresión de *foxd1* (G, I, Ñ-Q) y *foxg1* (H, J-N) en embriones control (G, I, K, M, Ñ y P) y mutantes *foxg1* (H y J) y *foxd1* (L, N, O y Q).

13. La especificación del dominio temporal es esencial para una correcta función visual.

Como se detalla en el apartado anterior, los mutantes *foxd1*^{-/-} no presentan un dominio temporal. La retina de estos mutantes presenta una expresión expandida de *efnA5* y una ausencia de *rtk2*, consistente con una nasalización de esta estructura. Como consecuencia de este cambio de identidad en el dominio posicionado temporalmente en la retina, los axones de las CGR no proyectan al tectum adecuadamente. En mutantes *foxd1*^{-/-}, las CGR inervan a lo largo de todo el tectum, independientemente de que estén posicionadas en la mitad nasal o en la mitad temporal de la retina (Fig. 30A-B). El potencial efecto que alteraciones de este tipo en la subdivisión NT de la retina tienen sobre la función visual no se conoce. En este apartado, nos propusimos explotar nuestras herramientas experimentales para analizar la función visual en embriones con una retina totalmente nasalizada o temporalizada. Para analizar el efecto que tiene la pérdida de identidad temporal, hacemos uso de los mutantes de *foxd1*^{-/-}. Para estudiar el efecto que conlleva la pérdida de identidad nasal, llevamos a cabo el análisis de los embriones *Tg(rx3::gal4); UAS:shh*. La elección de esta condición experimental para reproducir la pérdida de identidad nasal se basa en que los mutantes de *foxd1*, además de una pérdida de identidad temporal en la retina, también muestran defectos en el telencéfalo (Martynoga et al., 2005). Razonamos que alteraciones en el prosencéfalo dorsal podrían perturbar la correcta formación del sistema visual, y por tanto no consideramos el fondo *foxd1*^{-/-} apropiado para este análisis.

El análisis de la función visual es un proceso altamente complejo, ya que depende de múltiples factores, como la distribución de las células en la retina y la innervación de los centros de procesamiento visual. Puesto que no se dispone de un test específico para correlacionar la subdivisión NT de la retina con la correcta visión de la larva, llevamos a cabo un test que mide la respuesta optocinética (ROC) (Brockhoff, 2006), el cual se ha utilizado ampliamente para identificar mutantes con defectos en el sistema visual (Huang and Neuhauss, 2008). La ROC es un movimiento compensatorio involuntario del ojo en forma de sacadas en respuesta al movimiento de alrededor, que sirve para estabilizar la imagen visual en la retina, permitiendo una agudeza visual óptima. Numerosos estudios sugieren que la agudeza visual está mediada por las células selectivas de dirección. En la retina, las células selectivas de dirección son CGR que proyectan en los núcleos ópticos accesorios, en el pretectum, encargados de llevar a cabo la respuesta optocinética (Nikolaou et al., 2012; Vaney et al., 2012). La región ventro-temporal de la retina de peces presenta una mayor densidad de CGR, y se ha propuesto que esta región podría estar implicada en conferir agudeza visual al pez (Mangrum et al., 2002; Pita et al., 2015). Por tanto, la medición de la ROC nos puede aportar información sobre la importancia de la

subdivisión NT de la retina para la agudeza visual del pez cebra. En este test sometemos a la larva a un estímulo visual en el cual van variando los tres parámetros (frecuencia espacial, velocidad y contraste) de los cuales depende la ROC, manteniendo los otros dos parámetros a niveles óptimos. De esta forma, podemos analizar el efecto independiente de cada parámetro sobre la respuesta optocinética.

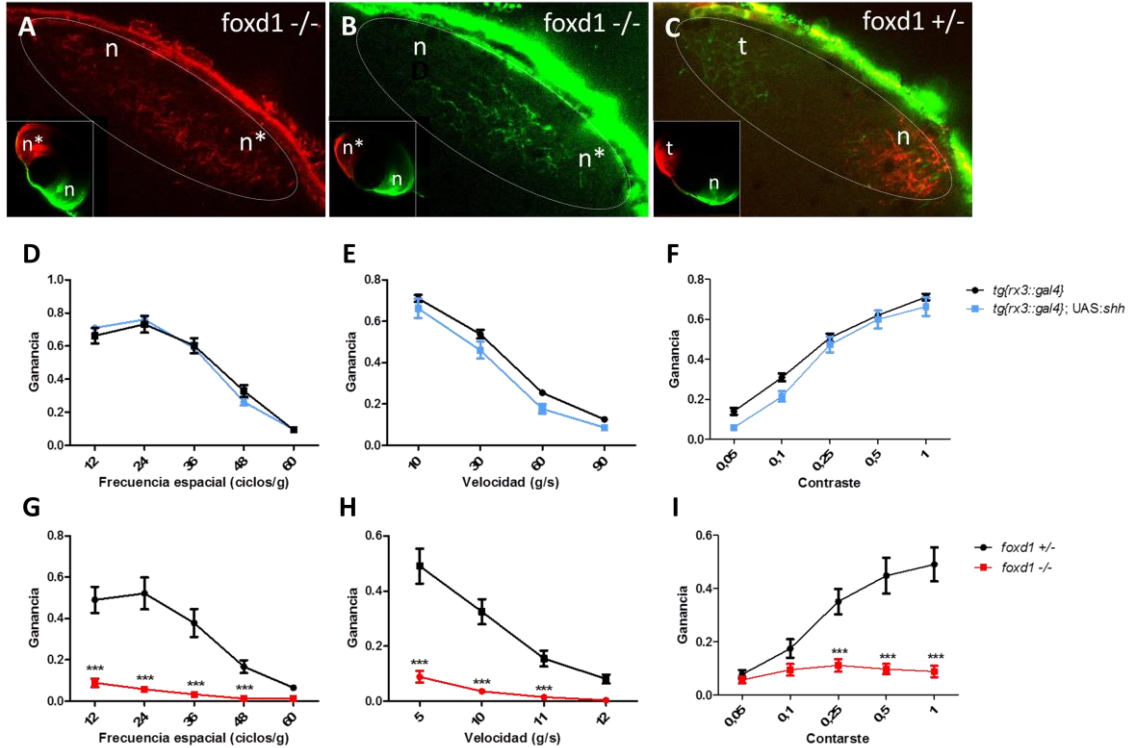


Figura 30. Respuesta optocinética en embriones con pérdida de identidad nasal y temporal en la retina. (A-C) Vista dorsal del tectum y el ojo correspondiente de embriones de 6 dpf *foxd1*^{-/-} (A y B) y *foxd1*^{+/-} (C) en los cuales se ha trazado con DiO/Dil las CGR en la región nasal (rojo) y temporal (verde) de la retina. Las líneas delimitan el tectum y el ojo correspondiente (anterior hacia la derecha). Gráficos que representan la respuesta optocinética medida en forma de ganancia, ante un estímulo visual variando su frecuencia espacial (D y G), velocidad (E y H) y contraste (F e I). Las gráficas D-F representan la ROC en embriones *Tg{rx3::gal4}* (negro) y *Tg{rx3::gal4}; UAS:shh* (azul). Las gráficas G-I representan la ROC en embriones *foxd1*^{+/-} (negro) y *foxd1*^{-/-} (rojo). n=identidad nasal, t=identidad temporal, n*= ganancia de identidad nasal. Las líneas delimitan el prosencéfalo desde una vista dorsal, y las vesículas ópticas desde una vista frontal.

La realización del test de ROC en embriones carentes de identidad temporal (mutantes de *foxd1*) reveló una gran disfunción del comportamiento visual. Así, a una velocidad del estímulo mínima de 10 grados/segundos la amplitud de la ROC disminuye en un 82%, reduciéndose progresivamente hasta en un 95% según aumenta la velocidad del estímulo (Fig.

30H). De igual manera, el valor de esta respuesta no supera el 18% del valor control ante diferentes condiciones de frecuencia espacial del estímulo (Fig. 30G). Así mismo, dichos embriones no presentan una respuesta optocinética mayor del 18% respecto a la máxima del control a diferente contraste del estímulo (Fig. 30I).

Sorprendentemente, los resultados del test de función visual en embriones carentes de identidad nasal en la retina [*Tg(rx3::gal4); UAS:shh*] no muestran alteraciones significativas de la función visual. En estos especímenes, observamos que su ROC cuando se modifican los parámetros del estímulo no difiere de los embriones control (Fig. 30D-F).

En conjunto, nuestros resultados sugieren que mientras que la pérdida de identidad nasal en la retina no afecta a la agudeza visual de la larva, la pérdida de identidad temporal parece tener una gran relevancia sobre la función visual del embrión, comprometiendo de manera extrema su capacidad para responder ante estímulos visuales.

DISCUSIÓN

Durante el desarrollo del sistema visual de vertebrados, la regionalización axial de la retina es esencial para establecer la morfología ocular y la correcta innervación de las CGR a las áreas visuales primarias del cerebro. El primer evento en la formación de patrones axiales es la subdivisión en dominios nasal y temporal de la retina. Como se describe en esta tesis doctoral, en el pez cebra esta subdivisión se establece durante la especificación del primordio de ojo, antes de la evaginación de las vesículas ópticas, e implica la adquisición de identidad nasal por parte de las células de la mitad dorsal del primordio de ojo, e identidad temporal por parte de los progenitores ubicados en la mitad ventral. La subdivisión NT del primordio de ojo se visualiza por la expresión complementaria de los factores de transcripción *Foxg1* y *Foxd1*, determinantes de identidad nasal y temporal, respectivamente.

Estudios previos en pez cebra muestran que los Fgfs, cuya fuente de señalización es el prosencéfalo dorsal, promueven la especificación de identidad nasal en el dominio dorsal del primordio de ojo, mediante la inducción de la expresión *foxg1* (Picker and Brand, 2005). Los resultados expuestos en esta tesis doctoral indican que mecanismos moleculares adicionales participan en la adquisición de identidad temporal y la regulación de la expresión de *foxd1*.

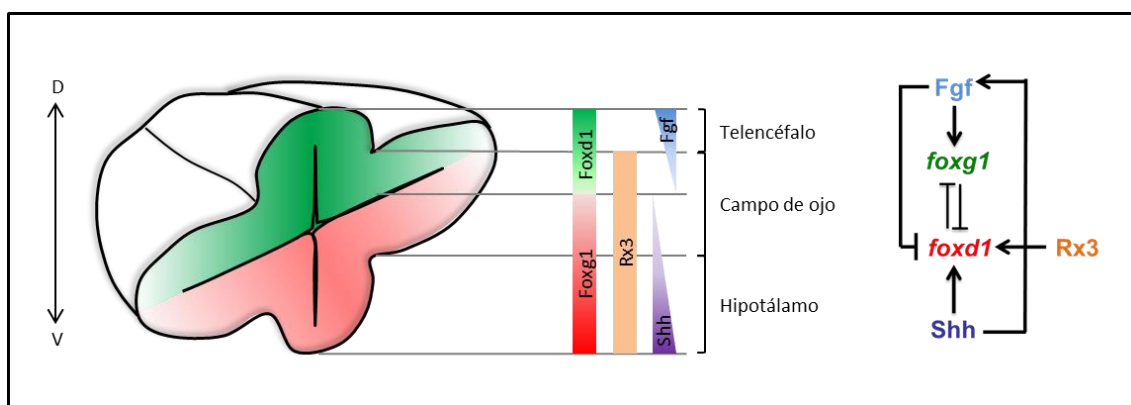


Figura 31. Modelo del establecimiento de la subdivisión NT del primordio de ojo. La actividad de Rx3 en el primordio de ojo promueve la expresión de *foxd1*. En paralelo, la señalización de Fgf desde el telencéfalo promueve la expresión de *foxg1* en la mitad dorsal del primordio de ojo, y la señalización de Shh refuerza y mantiene la expresión de *foxd1* en la mitad ventral, contrarrestando la inhibición de *foxd1* por los Fgfs. La represión mutua entre los determinantes NT refina y mantiene el borde entre ambos dominios.

En base a nuestros resultados, proponemos el modelo presentado en la Figura 31. Según este modelo, la inducción de identidad temporal requeriría la actividad del factor de transcripción Rx3 y de la vía de señalización de Hh. Rx3 se expresa en el campo de ojo desde el

momento de su especificación. Rx3 activa una cascada de regulación génica involucrada en conferir identidad de ojo y en controlar el proceso morfogénico que sufren las células del primordio de ojo para dar lugar a las vesículas ópticas (Kennedy et al., 2004; Loosli et al., 2001). Nuestros resultados sugieren que además, Rx3 está involucrado en establecer la subdivisión NT de la retina, aportando competencia a todas las células del campo de ojo para expresar el determinante de identidad temporal *Foxd1*. La actividad de Shh, emanando desde la línea media ventral, tejido adyacente a la mitad ventral del primordio de ojo, refuerza y mantiene la expresión de *foxd1* en este territorio durante la evaginación de las vesículas ópticas. Shh contrarresta de esta manera la represión de *foxd1* por parte de la ruta de señalización de Fgf, y consolida el establecimiento de la región temporal de la retina.

Nuestros resultados apoyan un escenario en el cual la actividad temprana de Fgfs y Shh refuerza la expresión de *foxg1* y *foxd1* en la mitad dorsal y ventral, respectivamente, del primordio de ojo y a la vez actúan reprimiendo parcialmente la expresión del factor de transcripción complementario. En efecto, la sobreexpresión homogénea de *fgf8* en todo el primordio de ojo resulta en una reducción parcial de los niveles de *foxd1*, sin promover la expansión de *foxg1*, represor directo de *foxd1*. Por otro lado, la falta simultánea de actividad de las rutas de señalización de Fgf y Shh resulta en una expansión de *foxd1*, sugiriendo que Fgf reprime directamente la expresión de este gen. La falta de expansión de *foxg1* en situaciones de sobreexpresión de Fgf sugiere, a su vez, que existen factores involucrados en reprimir su expresión en la región ventral del primordio de ojo. Shh podría contribuir a esta represión. En efecto, a pesar de que eliminar la función de Shh a partir de 1 ss en condiciones de sobreexpresión de Fgf8 no conlleva la expansión de *foxg1* (Figura 18H), no podemos descartar un requerimiento de Shh anterior a 1ss.

Una vez establecida la expresión inicial de *Foxg1* y *Foxd1*, éstos se reprimen mutuamente, de manera similar a lo observado en ratón y pollo (Huh et al., 1999; Takahashi et al., 2009; Takahashi et al., 2003). Esta represión mutua refina y mantiene en estadios posteriores del desarrollo embrionario el límite entre la región dorsal y ventral del primordio de ojo.

Rx3 participa en la regionalización del campo de ojo

Los mutantes de falta de función de *rx3* muestran una ausencia total de ojos en todos los organismos analizados (Loosli et al., 2001; Mathers et al., 1997). El mutante de *rx* en ratón conduce a la inhibición de la expresión de múltiples determinantes de campo de ojo desde

estadios muy tempranos; debido a ello, el desarrollo del ojo se detiene antes de la evaginación de las vesículas ópticas (Fish et al., 2014; Mathers et al., 1997; Medina-Martinez et al., 2009; Zhang et al., 2000). Sin embargo, tanto en *Xenopus* como en pez, la expresión de genes esenciales para la formación del primordio de ojo como *six3* y *pax6* y las interacciones reguladoras entre ellos permanecen inalteradas en ausencia de *rx3*. Además, la sobreexpresión de *six3* en un fondo carente de la actividad de Rx es capaz de generar primordios de ojo ectópicos (Fish et al., 2014; Loosli et al., 2001). Estos resultados indican que en estos organismos, la función de *rx* parece dispensable durante las etapas iniciales de especificación del campo de ojo, siendo requerido para la evaginación de las vesículas ópticas y el mantenimiento de la identidad de ojo (Fish et al., 2014; Loosli et al., 2003; Loosli et al., 2001; Rembold et al., 2006).

Rx3 es además necesario para la segregación de los dominios del campo de ojo y del telencéfalo durante la regionalización de la placa neural (Stigloher et al., 2006). Estudios previos han mostrado que Rx3 reprime la adquisición de identidad de telencéfalo, limitando así este dominio a una franja de células en el borde más anterior de la placa neural. En efecto, en ausencia de *rx3* se observa una expansión de la expresión de *tlc*, mientras que la ganancia de función conlleva la inhibición de su expresión (Stigloher et al., 2006). Tlc es un antagonista de la vía de Wnt/ β -catenina y promueve la expresión de genes de identidad telencefálica de manera indirecta, manteniendo dicha ruta inactiva (Houart et al., 2002). La expresión de *foxd1*, marcador tanto de identidad telencefálica como de identidad nasal en el primordio de ojo, también está ampliamente expandida en falta de función de Rx3 (Stigloher et al., 2006).

En base a la expansión del patrón de expresión de *tlc* y *foxd1* en ausencia de *rx3*, se ha propuesto que Rx3 actúa inhibiendo la expresión de genes de identidad de telencéfalo, y que por tanto su falta de función conlleva la expansión del territorio de telencéfalo a expensas del de campo de ojo. Esto plantea la posibilidad de que los fenotipos que observamos en nuestras manipulaciones no se puedan interpretar como alteraciones en el patrón NT del campo de ojo, sino simplemente como una expansión del dominio telencefálico. Sin embargo, nosotros creemos que esto no es así. Por un lado, hay que tener en cuenta que Tlc no es un marcador definitivo y exclusivo de identidad telencefálica y que *Foxd1* es un marcador de identidad telencefálica y de identidad nasal en el dominio dorsal del primordio de ojo. Además, la expresión de *emx3*, marcador exclusivo de identidad telencefálica, tan sólo se ve expandida sutilmente en ausencia de *rx3* (Stigloher et al., 2006). Por último, nuestros resultados indican que la falta de señalización de Fgf conduce a la pérdida de la expresión de *foxd1* en el primordio de ojo, sin afectar a la expresión de *foxd1* telencefálica, tanto en una situación control como en ausencia de *rx3*. Así, embriones *chk* tratados con SU5402 presentan ausencia de expresión de

foxg1 en el territorio positivo para la expresión de *rx3*, mientras que la expresión de *foxg1* se mantiene en la región más dorsal, correspondiente al telencéfalo en condiciones control (Fig. 27L).

Teniendo en consideración todas estas observaciones, proponemos que la expansión temprana de la expresión de *foxg1* en el dominio de expresión de *rx3* en los mutantes *chk*^{-/-} refleja una expansión del dominio de identidad nasal. A medida que el embrión se desarrolla, la falta de función de Rx3 en mutantes *chk*^{-/-} se traduce en una falta de evaginación del campo de ojo para dar lugar a las vesículas ópticas, y la incapacidad de estas células de mantener la identidad de ojo. Debido a ello, se observa una gran cantidad de muerte celular en el territorio que debía haber evaginado (no mostrado; (Stigloher et al., 2006)). Sin embargo, las células que sobreviven, al carecer de identidad de ojo, finalmente adquieren identidad telencefálica, puesto que están bajo la influencia de señales como Tlc que promueven la expresión de genes de identidad telencefálica ((Stigloher et al., 2006) y nuestras observaciones preliminares).

La recuperación de la expresión de *foxd1* en los trasplantes de células control en embriones *chk* sugiere que Rx3 induce la expresión de *foxd1* de manera directa. Este resultado es consistente con la presencia de secuencias de unión de Rx3 en la región promotora de *foxd1* (Yin et al., 2014). Además, la falta de actividad simultánea de Shh y Rx3 conlleva la pérdida total de la expresión de *foxd1* en el primordio de ojo.

Nuestras observaciones predecían que la falta simultánea de Rx3, Fgf y Shh debería dar lugar a un primordio de ojo sin expresión alguna de marcadores NT. Sorprendentemente, estas manipulaciones resultan en la expansión de *foxg1* a todo el campo de ojo. Este resultado sugiere que además de Fgf, otros factores deben participar en la inducción de *foxg1*. Estudios previos han demostrado que Six3, cuyo patrón de expresión temprana abarca el telencéfalo, el hipotálamo y el campo de ojo, regula la expresión de *foxg1* en el telencéfalo (Beccari et al., 2012; Carlin et al., 2012). Esto plantea la posibilidad de que Six3 también sea requerido para la expresión de *foxg1* en el primordio de ojo, contribuyendo así a la adquisición de identidad nasal en la retina.

Resulta interesante resaltar que la falta simultánea de Fgf, Shh y *rx3* es la única condición experimental en la que hemos observado la expansión completa de *foxg1* en el primordio de ojo. El hecho de que esta expansión no se observe en ninguna otra condición puede deberse a la existencia de relaciones reguladoras adicionales, hasta ahora no identificadas, entre los diferentes componentes moleculares que participan en la regionalización NT.

Acoplamiento entre el establecimiento del eje NT y la morfogénesis del primordio de ojo

Las células del campo de ojo se intercalan extensivamente unas entre otras según se incorporan al primordio en evaginación (Ivanovitch et al., 2013) (Figura 4). Esta reorganización de los progenitores de ojo sugería que no es posible predecir el destino final de las células sin polarizar agrupadas centralmente en el primordio de ojo antes de que estas adquirieran su disposición final dentro de las vesículas ópticas, y que solamente entonces adquirirían su identidad final. Los resultados mostrados en esta tesis indican por el contrario que las señales que influyen en la regionalización NT actúan desde estadios muy tempranos, adquiriéndose la expresión complementaria de *Foxg1* y *Foxd1* en la mitad dorsal y ventral del primordio de ojo antes del comienzo de la evaginación de las vesículas ópticas (Fig. 14A-B). Las señales requeridas para el establecimiento del patrón NT se producen y secretan por territorios del prosencéfalo dorsal y ventral que en este contexto estarían funcionando como organizadores del patrón NT. Estos territorios constituyen dominios fijos relativos al campo de ojo y las vesículas ópticas, y las moléculas por ellos secretadas ejercen su influencia sobre las células entrando en la mitad dorsal o ventral del primordio de ojo, independientemente de su localización original dentro del campo de ojo antes de su evaginación. Postulamos que este acoplamiento estrecho entre reorganización celular y adquisición de identidad regional en el campo de ojo contribuye a proporcionar solidez al proceso de regionalización NT del primordio de ojo.

Las señales de Shh y Fgf actúan coordinadamente en la regionalización de múltiples sistemas

Nuestros estudios revelan una función temprana, hasta ahora no apreciada, de la vía de señalización de Hh en el establecimiento del patrón NT de la retina. Numerosos estudios previos han demostrado el papel tanto de Hh como de Fgf en la formación del eje PD de la retina. La región más anterior de las vesículas ópticas dará lugar a la región proximal del primordio de ojo, el tallo óptico. Esta región de la vesícula óptica es adyacente al territorio del prosencéfalo donde confluyen el hipotálamo y el telencéfalo, territorios del sistema nervioso que expresan y secretan Shh y Fgfs, respectivamente (Fig. 16A,G). La actividad simultánea de Hh y Fgf sobre la región proximal/anterior de la vesícula óptica promueve la expresión de *pax2* y la adquisición de identidad de tallo óptico. De manera consistente con esta función, alteraciones en los niveles de actividad de Hh y Fgf pueden desplazar el borde entre el tallo óptico y la retina y perturbar la morfogénesis del tallo óptico (Cardozo et al., 2014; Chiang et al., 1996; Ekker et al., 1995; Lupo

et al., 2005; Macdonald et al., 1995; Martinez-Morales et al., 2005; Perron et al., 2003; Takeuchi et al., 2003; Walshe and Mason, 2003).

En regiones más posteriores del prosencéfalo el telencéfalo y el hipotálamo están separados físicamente por el primordio de ojo. Aquí, las células de la vesícula óptica posicionadas en la mitad dorsal reciben mayores niveles de Fgfs, mientras que las células de la mitad ventral reciben mayores niveles de Hh. En base a esto, proponemos que las diferentes funciones de estas dos vías de señalización durante la evaginación de las vesículas ópticas (especificación del tallo óptico y establecimiento de identidad NT) se deben a la distribución espacial diferencial de ambas señales sobre los diferentes territorios del primordio de ojo:

Durante la regionalización NT del primordio de ojo, las vías de señalización de Shh y Fgfs muestran una regulación cruzada limitada. Sin embargo, en la región más rostral del prosencéfalo, donde confluyen ambas señales, estas se regulan mutuamente modulando el patrón telencefálico. Así, en este territorio, Shh promueve la expresión de *fgf8* mientras que Fgf promueve la expresión basal de Shh (Aoto et al., 2002; Danesin et al., 2009; Ohkubo et al., 2002; Shanmugalingam et al., 2000; Shinya et al., 2001; Storm et al., 2006; Walshe and Mason, 2003). De manera similar, en la variedad de la cueva de la especie *Astyanax mexicanus*, los mayores niveles de expresión de *shh* en la placa neural se correlacionan con una expresión precoz de *fgf8* en el telencéfalo prospectivo (Menuet et al., 2007; Pottin et al., 2011).

En el tubo neural ventral, las actividades coordinadas de Fgf y Shh regulan la generación de diversidad celular de una manera mecanísticamente similar a lo observado en el primordio de ojo (Morales et al., 2016; Sasai et al., 2014). En este contexto, la coincidencia espacio-temporal de la señalización de Shh y Fgf en el tubo neural caudal proporciona una competencia limitada temporalmente para iniciar la especificación de la placa del suelo en la región más ventral del tubo neural. A medida que el tubo neural se extiende, la fuente de Fgfs se distancia de la médula espinal ventral y la actividad de Shh promueve, de manera independiente a Fgf, diferentes identidades neuronales en el eje DV del tubo neural. Así, Shh controla la expresión de múltiples factores de transcripción que subdividen colectivamente el tubo neural en dominios discretos a lo largo de su eje DV (Dessaud et al., 2008). Estos genes regulados por Shh se expresan en dominios adyacentes del tubo neural y frecuentemente muestran una represión mutua; como consecuencia, el borde entre dominios adyacentes se refina y las células que se encuentran a ambos lados del mismo acaban adquiriendo una única identidad (Cohen et al., 2013). Como se discute más arriba, este mecanismo de represión mutua se observa también en el borde entre los dominios nasal y temporal de la vesícula óptica, lugar

donde las células recibirían niveles más o menos equivalentes de Fgf y Shh y, por tanto, serían capaces de diferenciarse tanto con identidad nasal como con identidad temporal. Un mecanismo de represión mutua como el aquí descrito permitiría que el gradiente de actividad temprano de Shh y Fgf se tradujera en un borde NT nítido que se mantendría en estadios más tardíos del desarrollo del ojo.

Durante la formación del patrón AP de la vesícula ótica, el primordio del oído de vertebrados, la señalización por Shh y Fgfs tiene también una función similar a la descrita en esta tesis. La actividad de Fgf secretado por tejidos situados rostralmente a la vesícula ótica induce identidad anterior, mientras que la señalización de Shh desde los tejidos subyacentes promueve identidad posterior (Hammond et al., 2003; Hammond and Whitfield, 2011). A diferencia de lo que ocurre en el patrón NT de la retina, la manipulación de los niveles de ambas vías de señalización afecta a la formación del patrón AP de la vesícula ótica de manera recíproca. Así, la pérdida de la actividad de Fgf resulta en la ausencia de identidad anterior y el desarrollo de un primordio con identidad posterior doble; inversamente, la falta de la actividad de Shh conduce a la pérdida de identidad posterior y el desarrollo de un primordio parcialmente anterior doble. Sin embargo, la pérdida simultánea de Shh y Fgfs resulta en una vesícula ótica carente de subdivisión AP, mientras que en la regionalización NT de las vesículas óticas el patrón se recupera parcialmente en estas condiciones. Esta regulación diferencial en ambos primordios indica que, mientras que el establecimiento de identidad anterior y posterior en el primordio ótico es controlada por Fgf y Shh de manera independiente entre sí, la expresión de *foxd1* en el primordio de ojo está bajo la influencia de ambas vías de señalización, y requiere de la función de Shh para contrarrestar la represión dependiente de Fgf.

Los ejemplos citados arriba corresponden todos a distintos aspectos de diferenciación del sistema nervioso y sus derivados; sin embargo, este no es el único órgano donde Fgf y Shh establecen relaciones reguladoras. Por ejemplo, durante el desarrollo de las extremidades de vertebrados, Shh (expresado en la parte posterior del primordio, conocida como la zona de actividad polarizante) y Fgfs (expresados en la porción distal del primordio de la extremidad, denominada cresta apical ectodérmica) están involucrados en un circuito de retroalimentación regulador esencial para la asignación de las proporciones correctas de la extremidad (Benazet et al., 2009; Scherz et al., 2004; Zuniga et al., 1999). En conclusión, estas vías de señalización establecen complejas relaciones reguladoras en múltiples contextos en el embrión en desarrollo.

La regionalización NT de la retina especifica el mapa retinotectal

La regionalización NT es fundamental para especificar correctamente las CGR, las cuales proyectarán sus axones a los núcleos visuales del cerebro. En pez cebra, las CGR inervan el tectum a lo largo de su eje AP en base a su disposición en el eje NT en la retina. En una situación control, los axones de las CGR posicionadas en la mitad nasal de la retina inervan la región posterior del tectum, mientras que las CGR posicionadas en el dominio temporal proyectan en la región anterior (Figura 32). Esta distribución espacial se debe a los gradientes de efrinas-A y sus receptores Eph-A que se expresan tanto en las CGR como en el tectum, y cuya interacción resulta en una respuesta repulsiva (Suetterlin et al., 2012). En la retina encontramos un gradiente de receptores Eph creciente de nasal a temporal, mientras que la expresión de efrinas muestra un gradiente decreciente, con mayor concentración de efrinas en el dominio nasal. De igual manera, la expresión de Ephs en el tectum presenta un gradiente decreciente de rostral a caudal, mientras que las efrinas muestran un gradiente opuesto (Suetterlin et al., 2012) (Figura 32).

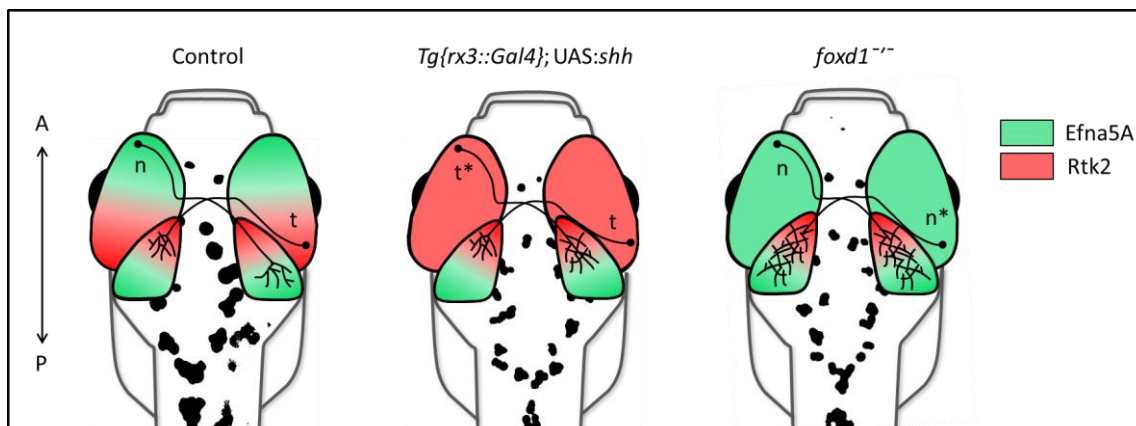


Figura 32. Mapa retinotectal en ausencia de identidad nasal y temporal. La invasión de las CGR en el tectum se correlaciona con la adquisición de identidad NT en la retina. En una condición control, en el dominio nasal se expresa la *efna5A* y en el temporal el receptor Eph *rtk2*. Estos gradientes de expresión se observan también en el tectum caudal y rostral respectivamente. Debido a la repulsión que ejercen las efrinas sobre sus receptores Eph, las CGR temporales inervan en el tectum rostral y las nasales en el tectum caudal. En los embriones *Tg{rx3::gal4}; UAS:shh*, la pérdida de identidad nasal conduce a expansión de *Rtk2* a toda la retina, por lo que las CGR inervan sólo el tectum rostral, ya que son repelidos por la *Efna5A* del tectum caudal. En los mutantes *foxd1^{-/-}*, la pérdida del determinante temporal conduce a la expansión de la identidad nasal y la expresión de *efna5A* a toda la retina. En esta condición, las CGR inervan a lo largo de todo el tectum.

El análisis de las proyecciones retinotectales en retinas con sobreexpresión de Shh (*Tg{rx3::gal4};UAS:shh*) es consistente con el hecho de que las CGR en estas condiciones han adquirido identidad temporal. Las proyecciones de la región anterior de la retina en estos embriones inervan regiones más anteriores del tectum (Figura 32), reflejando el hecho de que altos niveles de efrinas en el tectum caudal provocan repulsión sobre los axones de CGRs con

identidad temporal (Cheng et al., 1995; Drescher et al., 1995; Feldheim et al., 2000; Monschau et al., 1997; Nakamoto et al., 1996), cuyos conos de crecimiento presentan a su vez altos niveles de receptores Eph (Brown et al., 2000; Menzel et al., 2001) (Carreres et al., 2011; Feldheim et al., 2004).

Los mutantes para *foxd1* representan la condición opuesta en la cual la retina está completamente nasalizada a consecuencia de la falta de función del determinante temporal. En esta situación los axones de las CGR inervan el tectum de manera dispersa a lo largo de todo el eje AP, independientemente de su posición en la retina (Figura 32). Esta situación es consistente con lo que se esperaría de una retina totalmente nasalizada. Las CGR con identidad nasal expresan mayor concentración de efrinas en su membrana, y menores niveles de Ephs; esto resulta en una disminución de la respuesta repulsiva hacia regiones del tectum con altos niveles de efrinas, previniendo así la repulsión de las CGR nasales por parte del tectum anterior (Carvalho et al., 2006; Dutting et al., 1999; Hornberger et al., 1999). Debido a ello, las CGR en esta situación tienen la capacidad de inervar indistintamente el tectum anterior o posterior, como se ha demostrado en estudios in vitro en pollo (Walter et al., 1987). Otro elemento importante a tener en cuenta para el refinamiento del mapa retinotectal es la existencia de repulsión mutua interaxonal (Bevins et al., 2011; Flanagan, 2006; Gebhardt et al., 2012; Pfeifferberger et al., 2006; Reber et al., 2004; Simpson et al., 2009). La expresión diferencial de efrinas y Ephs de las CGR nasales y temporales crea repulsión entre las fibras, haciendo colapsar los conos de crecimiento temporales al contacto con los axones de las CGR nasales (Raper and Grunewald, 1990). Esto explica por qué a pesar de que las CGR nasales no muestran repulsión hacia el tectum rostral, en una condición control sus proyecciones permanecen recluidas al tectum caudal. La ausencia de proyecciones con identidad temporal en los mutantes *foxd1* eliminaría esta repulsión y permitiría la inervación a lo largo de todo el tectum por parte de las CGR con identidad nasal.

La subdivisión NT de la retina y la función visual

Los estudios funcionales que hemos realizado analizando la respuesta optocinética en las condiciones descritas en la sección anterior indican que estas alteraciones en el patrón NT de la retina tienen consecuencias importantes para la función visual. El análisis de la ROC en

condiciones en las cuales los embriones presentan pérdida de identidad nasal o temporal, sugiere que la presencia de un dominio con identidad temporal en la retina es esencial para la agudeza visual. Sin embargo, el dominio con identidad nasal no parece tener gran relevancia para la agudeza visual.

La percepción del flujo óptico, que deriva en la respuesta optocinética, está mediada por células selectivas de dirección y sus centros dianas, los núcleos ópticos accesorios, posicionados en la zona pretectal. Esta interacción permite la generación de movimientos reflejos oculares que compensan el movimiento de alrededor, permitiendo estabilizar la imagen y adquirir agudeza visual (Borst and Euler, 2011; Simpson, 1984). Las células selectivas de dirección se caracterizan por sus respuestas asimétricas a estímulos que se mueven en diferentes direcciones. Se encuentran células selectivas de dirección a muchos niveles en el sistema visual; en la retina, la selectividad de dirección es implementada por las CGR, mostrando una preferencia asimétrica según la dirección del estímulo (Nikolaou et al., 2012; Vaney et al., 2012). El hecho de que alteraciones en la subdivisión NT de la retina conduzca a defectos en la ROC, sugiere que la regionalización NT podría estar involucrada en la disposición de las CGR selectivas de dirección en la retina. Apoyando la idea de que el dominio temporal es esencial para la agudeza visual del pez, estudios previos han identificado una región con mayor densidad de CGR en la retina ventro-temporal. La densidad de las CGR en esta región es hasta tres veces superior que en otras zonas de la retina (Mangrum et al., 2002; Pita et al., 2015). Esta región podría tratarse de un centro de agudeza visual del pez, con una función similar a la fovea en humanos. Esta distribución asimétrica de la densidad de las CGR se ha observado también en pollo (da Silva and Cepko, 2017).

No podemos descartar que los defectos en la función visual que observamos con el test de ROC se deban también a defectos en la composición de otros tipos neuronales en la retina de las condiciones manipuladas. En condiciones control, la retina muestra patrones de organización diferenciales de tipos neuronales, aunque se desconoce la relevancia funcional que esto pueda tener. Por ejemplo, hay una distribución asimétrica en el eje NT de células bipolares, amacrinas, y fotorreceptores en cuanto a densidad y tipo (Branchek and Bremiller, 1984; Zimmermann et al., 2017), que podría venir determinada por los mecanismos moleculares que establecen la regionalización NT de la retina.

Otra posibilidad que debemos considerar es que nuestras condiciones experimentales afecten a la invasión de los núcleos que conforman el área pretectal. Foxd1 se expresa en las CGR temporales y en el diencefalo ventral durante la formación del quiasma óptico. En el

mutante de *foxd1* en ratón se observa la ausencia de Foxd1 y la expansión de Foxg1 en el diencéfalo ventral (Herrera et al., 2004). Estas alteraciones tienen como consecuencia aberraciones en las proyecciones de las CGR ventrotemporales, que en ratón proyectan ipsilateralmente. En los mutantes *foxd1*, estas proyecciones no son rechazadas por el quiasma y proyectan de forma aberrante, contralateralmente. Además de una pérdida del programa ipsilateral en la retina, estos mutantes presentan un estancamiento de las proyecciones de parte de las CGR contralaterales a nivel del quiasma óptico, que no llegan a cruzarlo para inervar su diana en el tálamo (Herrera et al., 2004). Los peces carecen de programa ipsilateral, por lo que todas las CGR inervan contralateralmente. Sin embargo, *foxg1* y *foxd1* también se expresan de manera complementaria en el receso óptico (Affaticati et al., 2015), y no sería sorprendente que los mutantes en *foxd1* presentasen igualmente defectos en guía axonal a nivel de quiasma óptico. Estos problemas en la guía axonal podrían ocasionar aberraciones en la formación de los núcleos accesorios del pretectum, afectando por tanto a la respuesta optocinética.

CONCLUSIONES

- I. La expresión de *foxd1* en la región temporal de las vesículas ópticas es establecida por la función coordinada de Rx3, Fgfs y Shh. Rx3 induce la expresión de *foxd1* en el campo de ojo de manera autónoma celular. De manera simultánea, los Fgfs desde el prosencéfalo dorsal promueven la expresión de *foxd1* en la mitad dorsal del primordio de ojo. Esto se traduce en una represión de *foxd1* en dicha región del primordio de ojo. Shh, secretado por el hipotálamo, refuerza y mantiene la expresión de *foxd1* en la mitad ventral, contrarrestando su represión por parte de los Fgfs y *foxd1*.
- II. Shh es necesario para inducir *foxd1* en una ventana restringida de tiempo que abarca desde final de gastrulación hasta 6 ss, cuando el patrón NT ya está especificado. La expresión ectópica de *shh* es suficiente para expandir la expresión de *foxd1* en el primordio de ojo y temporalizar la retina.
- III. La señalización de Fgf8 es necesaria para inducir identidad nasal, pero su expresión ectópica no es suficiente para transformar de manera completa el dominio temporal en nasal.
- IV. El patrón NT de la retina depende del balance de los niveles de actividad de las vías de señalización de Fgf y Shh.
- V. La vía de señalización de Nodal no es determinante para la expresión de *foxd1* en el primordio de ojo.
- VI. La expansión de *foxd1* y de *foxd1* en el primordio de ojo conduce a la nasalización y temporalización de la retina, respectivamente. Estas alteraciones se traducen en la formación de un mapa retinotectal caudalizado y rostralizado respectivamente.
- VII. Una vez establecidos sus dominios de expresión, *Foxg1* y *Foxd1* muestran represión transcripcional mutua, delimitando y manteniendo los dominios nasal y temporal.
- VIII. El establecimiento de un dominio con identidad temporal en la retina es esencial para una correcta agudeza visual. Larvas con una retina nasalizada tienen su agudeza visual comprometida. Por el contrario, larvas con una retina temporalizada no presentan deficiencias significativas en su función visual.

REFERENCIAS

- Abate-Shen, C. and Shen, M. M.** (2007). FGF signaling in prostate tumorigenesis--new insights into epithelial-stromal interactions. *Cancer cell* **12**, 495-497.
- Affaticati, P., Yamamoto, K., Rizzi, B., Bureau, C., Peyrieras, N., Pasqualini, C., Demarque, M. and Vernier, P.** (2015). Identification of the optic recess region as a morphogenetic entity in the zebrafish forebrain. *Scientific reports* **5**, 8738.
- Aoto, K., Nishimura, T., Eto, K. and Motoyama, J.** (2002). Mouse GLI3 regulates Fgf8 expression and apoptosis in the developing neural tube, face, and limb bud. *Developmental biology* **251**, 320-332.
- Armelin, H. A.** (1973). Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **70**, 2702-2706.
- Baier, H., Klostermann, S., Trowe, T., Karlstrom, R. O., Nusslein-Volhard, C. and Bonhoeffer, F.** (1996). Genetic dissection of the retinotectal projection. *Development* **123**, 415-425.
- Beccari, L., Conte, I., Cisneros, E. and Bovolenta, P.** (2012). Sox2-mediated differential activation of Six3.2 contributes to forebrain patterning. *Development* **139**, 151-164.
- Benazet, J. D., Bischofberger, M., Tiecke, E., Goncalves, A., Martin, J. F., Zuniga, A., Naef, F. and Zeller, R.** (2009). A self-regulatory system of interlinked signaling feedback loops controls mouse limb patterning. *Science* **323**, 1050-1053.
- Bevins, N., Lemke, G. and Reber, M.** (2011). Genetic dissection of EphA receptor signaling dynamics during retinotopic mapping. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **31**, 10302-10310.
- Bharti, K., Gasper, M., Ou, J., Brucato, M., Clore-Gronenborn, K., Pickel, J. and Arnheiter, H.** (2012). A regulatory loop involving PAX6, MITF, and WNT signaling controls retinal pigment epithelium development. *PLoS genetics* **8**, e1002757.
- Bielen, H. and Houart, C.** (2012). BMP signaling protects telencephalic fate by repressing eye identity and its Cxcr4-dependent morphogenesis. *Developmental cell* **23**, 812-822.
- Borst, A. and Euler, T.** (2011). Seeing things in motion: models, circuits, and mechanisms. *Neuron* **71**, 974-994.
- Branchek, T. and Bremiller, R.** (1984). The development of photoreceptors in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. I. Structure. *The Journal of comparative neurology* **224**, 107-115.
- Brand, M., Heisenberg, C. P., Jiang, Y. J., Beuchle, D., Lun, K., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M., Kane, D. A., et al.** (1996). Mutations in zebrafish genes affecting the formation of the boundary between midbrain and hindbrain. *Development* **123**, 179-190.
- Braun, M. M., Etheridge, A., Bernard, A., Robertson, C. P. and Roelink, H.** (2003). Wnt signaling is required at distinct stages of development for the induction of the posterior forebrain. *Development* **130**, 5579-5587.
- Briscoe, J. and Therond, P. P.** (2013). The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nature reviews. Molecular cell biology* **14**, 416-429.
- Brockerhoff, S. E.** (2006). Measuring the optokinetic response of zebrafish larvae. *Nature protocols* **1**, 2448-2451.

- Brown, A., Yates, P. A., Burrola, P., Ortuno, D., Vaidya, A., Jessell, T. M., Pfaff, S. L., O'Leary, D. D. and Lemke, G.** (2000). Topographic mapping from the retina to the midbrain is controlled by relative but not absolute levels of EphA receptor signaling. *Cell* **102**, 77-88.
- Brown, K. E., Keller, P. J., Ramialison, M., Rembold, M., Stelzer, E. H., Loosli, F. and Wittbrodt, J.** (2010). Nlcam modulates midline convergence during anterior neural plate morphogenesis. *Developmental biology* **339**, 14-25.
- Brown, N. L., Kanekar, S., Vetter, M. L., Tucker, P. K., Gemza, D. L. and Glaser, T.** (1998). Math5 encodes a murine basic helix-loop-helix transcription factor expressed during early stages of retinal neurogenesis. *Development* **125**, 4821-4833.
- Buckles, G. R., Thorpe, C. J., Ramel, M. C. and Lekven, A. C.** (2004). Combinatorial Wnt control of zebrafish midbrain-hindbrain boundary formation. *Mechanisms of development* **121**, 437-447.
- Burrill, J. D. and Easter, S. S., Jr.** (1995). The first retinal axons and their microenvironment in zebrafish: cryptic pioneers and the pretract. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **15**, 2935-2947.
- Cardozo, M. J., Sanchez-Arrones, L., Sandonis, A., Sanchez-Camacho, C., Gestri, G., Wilson, S. W., Guerrero, I. and Bovolenta, P.** (2014). Cdon acts as a Hedgehog decoy receptor during proximal-distal patterning of the optic vesicle. *Nature communications* **5**, 4272.
- Carlin, D., Sepich, D., Grover, V. K., Cooper, M. K., Solnica-Krezel, L. and Inbal, A.** (2012). Six3 cooperates with Hedgehog signaling to specify ventral telencephalon by promoting early expression of Foxg1a and repressing Wnt signaling. *Development* **139**, 2614-2624.
- Carreres, M. I., Escalante, A., Murillo, B., Chauvin, G., Gaspar, P., Vegar, C. and Herrera, E.** (2011). Transcription factor Foxd1 is required for the specification of the temporal retina in mammals. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **31**, 5673-5681.
- Carrington, B., Varshney, G. K., Burgess, S. M. and Sood, R.** (2015). CRISPR-STAT: an easy and reliable PCR-based method to evaluate target-specific sgRNA activity. *Nucleic acids research* **43**, e157.
- Carvalho, R. F., Beutler, M., Marler, K. J., Knoll, B., Becker-Barroso, E., Heintzmann, R., Ng, T. and Drescher, U.** (2006). Silencing of EphA3 through a cis interaction with ephrinA5. *Nature neuroscience* **9**, 322-330.
- Cavodeassi, F.** (2014). Integration of anterior neural plate patterning and morphogenesis by the Wnt signaling pathway. *Developmental neurobiology* **74**, 759-771.
- Cavodeassi, F., Carreira-Barbosa, F., Young, R. M., Concha, M. L., Allende, M. L., Houart, C., Tada, M. and Wilson, S. W.** (2005). Early stages of zebrafish eye formation require the coordinated activity of Wnt11, Fz5, and the Wnt/beta-catenin pathway. *Neuron* **47**, 43-56.
- Cavodeassi, F., Del Bene, F., Furthauer, M., Grabher, C., Herzog, W., Lehtonen, S., Linker, C., Mercader, N., Mikut, R., Norton, W., et al.** (2013). Report of the Second European Zebrafish Principal Investigator Meeting in Karlsruhe, Germany, March 21-24, 2012. *Zebrafish* **10**, 119-123.
- Cavodeassi, F. and Houart, C.** (2012). Brain regionalization: of signaling centers and boundaries. *Developmental neurobiology* **72**, 218-233.
- Cepko, C.** (2014). Intrinsically different retinal progenitor cells produce specific types of progeny. *Nature reviews. Neuroscience* **15**, 615-627.

- Cohen, M., Briscoe, J. and Blassberg, R.** (2013). Morphogen interpretation: the transcriptional logic of neural tube patterning. *Current opinion in genetics & development* **23**, 423-428.
- Chen, J. K., Taipale, J., Cooper, M. K. and Beachy, P. A.** (2002). Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes & development* **16**, 2743-2748.
- Cheng, H. J., Nakamoto, M., Bergemann, A. D. and Flanagan, J. G.** (1995). Complementary gradients in expression and binding of ELF-1 and Mek4 in development of the topographic retinotectal projection map. *Cell* **82**, 371-381.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K. E., Corden, J. L., Westphal, H. and Beachy, P. A.** (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* **383**, 407-413.
- Chow, R. L. and Lang, R. A.** (2001). Early eye development in vertebrates. *Annual review of cell and developmental biology* **17**, 255-296.
- Chuang, J. C. and Raymond, P. A.** (2001). Zebrafish genes rx1 and rx2 help define the region of forebrain that gives rise to retina. *Developmental biology* **231**, 13-30.
- da Silva, S. and Cepko, C. L.** (2017). Fgf8 Expression and Degradation of Retinoic Acid Are Required for Patterning a High-Acuity Area in the Retina. *Developmental cell* **42**, 68-81 e66.
- Danesin, C., Peres, J. N., Johansson, M., Snowden, V., Cording, A., Papalopulu, N. and Houart, C.** (2009). Integration of telencephalic Wnt and hedgehog signaling center activities by Foxg1. *Developmental cell* **16**, 576-587.
- Dessaud, E., McMahon, A. P. and Briscoe, J.** (2008). Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Development* **135**, 2489-2503.
- Distel, M., Hocking, J. C., Volkmann, K. and Koster, R. W.** (2010). The centrosome neither persistently leads migration nor determines the site of axonogenesis in migrating neurons in vivo. *The Journal of cell biology* **191**, 875-890.
- Drescher, U., Kremoser, C., Handwerker, C., Loschinger, J., Noda, M. and Bonhoeffer, F.** (1995). In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases. *Cell* **82**, 359-370.
- Dutting, D., Handwerker, C. and Drescher, U.** (1999). Topographic targeting and pathfinding errors of retinal axons following overexpression of ephrinA ligands on retinal ganglion cell axons. *Developmental biology* **216**, 297-311.
- Easter, S. S., Jr. and Nicola, G. N.** (1996). The development of vision in the zebrafish (*Danio rerio*). *Developmental biology* **180**, 646-663.
- Eiraku, M., Takata, N., Ishibashi, H., Kawada, M., Sakakura, E., Okuda, S., Sekiguchi, K., Adachi, T. and Sasai, Y.** (2011). Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature* **472**, 51-56.
- Ekker, S. C., Ungar, A. R., Greenstein, P., von Kessler, D. P., Porter, J. A., Moon, R. T. and Beachy, P. A.** (1995). Patterning activities of vertebrate hedgehog proteins in the developing eye and brain. *Current biology : CB* **5**, 944-955.
- Erskine, L. and Herrera, E.** (2007). The retinal ganglion cell axon's journey: insights into molecular mechanisms of axon guidance. *Developmental biology* **308**, 1-14.
- (2014). Connecting the retina to the brain. *ASN neuro* **6**.

- Esteve, P. and Bovolenta, P.** (2006). Secreted inducers in vertebrate eye development: more functions for old morphogens. *Current opinion in neurobiology* **16**, 13-19.
- Esteve, P., Lopez-Rios, J. and Bovolenta, P.** (2004). SFRP1 is required for the proper establishment of the eye field in the medaka fish. *Mechanisms of development* **121**, 687-701.
- Feldheim, D. A., Kim, Y. I., Bergemann, A. D., Frisen, J., Barbacid, M. and Flanagan, J. G.** (2000). Genetic analysis of ephrin-A2 and ephrin-A5 shows their requirement in multiple aspects of retinocollicular mapping. *Neuron* **25**, 563-574.
- Feldheim, D. A., Nakamoto, M., Osterfield, M., Gale, N. W., DeChiara, T. M., Rohatgi, R., Yancopoulos, G. D. and Flanagan, J. G.** (2004). Loss-of-function analysis of EphA receptors in retinotectal mapping. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **24**, 2542-2550.
- Feldheim, D. A. and O'Leary, D. D.** (2010). Visual map development: bidirectional signaling, bifunctional guidance molecules, and competition. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**, a001768.
- Feldman, B., Gates, M. A., Egan, E. S., Dougan, S. T., Rennebeck, G., Sirotkin, H. I., Schier, A. F. and Talbot, W. S.** (1998). Zebrafish organizer development and germ-layer formation require nodal-related signals. *Nature* **395**, 181-185.
- Fish, M. B., Nakayama, T., Fisher, M., Hirsch, N., Cox, A., Reeder, R., Carruthers, S., Hall, A., Stemple, D. L. and Grainger, R. M.** (2014). Xenopus mutant reveals necessity of rax for specifying the eye field which otherwise forms tissue with telencephalic and diencephalic character. *Developmental biology* **395**, 317-330.
- Flanagan, J. G.** (2006). Neural map specification by gradients. *Current opinion in neurobiology* **16**, 59-66.
- Fricke, C., Lee, J. S., Geiger-Rudolph, S., Bonhoeffer, F. and Chien, C. B.** (2001). astray, a zebrafish roundabout homolog required for retinal axon guidance. *Science* **292**, 507-510.
- Fuhrmann, S.** (2010). Eye morphogenesis and patterning of the optic vesicle. *Current topics in developmental biology* **93**, 61-84.
- Fuhrmann, S., Levine, E. M. and Reh, T. A.** (2000). Extraocular mesenchyme patterns the optic vesicle during early eye development in the embryonic chick. *Development* **127**, 4599-4609.
- Furthauer, M., Reifers, F., Brand, M., Thisse, B. and Thisse, C.** (2001). sprouty4 acts in vivo as a feedback-induced antagonist of FGF signaling in zebrafish. *Development* **128**, 2175-2186.
- Gebhardt, C., Bastmeyer, M. and Weth, F.** (2012). Balancing of ephrin/Eph forward and reverse signaling as the driving force of adaptive topographic mapping. *Development* **139**, 335-345.
- Gritsman, K., Zhang, J., Cheng, S., Heckscher, E., Talbot, W. S. and Schier, A. F.** (1999). The EGF-CFC protein one-eyed pinhead is essential for nodal signaling. *Cell* **97**, 121-132.
- Halpern, M. E., Rhee, J., Goll, M. G., Akitake, C. M., Parsons, M. and Leach, S. D.** (2008). Gal4/UAS transgenic tools and their application to zebrafish. *Zebrafish* **5**, 97-110.
- Hammond, K. L., Loynes, H. E., Folarin, A. A., Smith, J. and Whitfield, T. T.** (2003). Hedgehog signalling is required for correct anteroposterior patterning of the zebrafish otic vesicle. *Development* **130**, 1403-1417.

- Hammond, K. L., van Eeden, F. J. and Whitfield, T. T.** (2010). Repression of Hedgehog signalling is required for the acquisition of dorsolateral cell fates in the zebrafish otic vesicle. *Development* **137**, 1361-1371.
- Hammond, K. L. and Whitfield, T. T.** (2011). Fgf and Hh signalling act on a symmetrical pre-pattern to specify anterior and posterior identity in the zebrafish otic placode and vesicle. *Development* **138**, 3977-3987.
- Harris, W. A.** (1997). Cellular diversification in the vertebrate retina. *Current opinion in genetics & development* **7**, 651-658.
- Hatini, V., Tao, W. and Lai, E.** (1994). Expression of winged helix genes, BF-1 and BF-2, define adjacent domains within the developing forebrain and retina. *Journal of neurobiology* **25**, 1293-1309.
- Hatta, K., Kimmel, C. B., Ho, R. K. and Walker, C.** (1991). The cyclops mutation blocks specification of the floor plate of the zebrafish central nervous system. *Nature* **350**, 339-341.
- Herrera, E., Marcus, R., Li, S., Williams, S. E., Erskine, L., Lai, E. and Mason, C.** (2004). Foxd1 is required for proper formation of the optic chiasm. *Development* **131**, 5727-5739.
- Hornberger, M. R., Dutting, D., Ciossek, T., Yamada, T., Handwerker, C., Lang, S., Weth, F., Huf, J., Wessel, R., Logan, C., et al.** (1999). Modulation of EphA receptor function by coexpressed ephrinA ligands on retinal ganglion cell axons. *Neuron* **22**, 731-742.
- Houart, C., Caneparo, L., Heisenberg, C., Barth, K., Take-Uchi, M. and Wilson, S.** (2002). Establishment of the telencephalon during gastrulation by local antagonism of Wnt signaling. *Neuron* **35**, 255-265.
- Hu, M. and Easter, S. S.** (1999). Retinal neurogenesis: the formation of the initial central patch of postmitotic cells. *Developmental biology* **207**, 309-321.
- Huang, P., Xiong, F., Megason, S. G. and Schier, A. F.** (2012). Attenuation of Notch and Hedgehog signaling is required for fate specification in the spinal cord. *PLoS genetics* **8**, e1002762.
- Huang, Y. Y. and Neuhauss, S. C.** (2008). The optokinetic response in zebrafish and its applications. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **13**, 1899-1916.
- Huh, S., Hatini, V., Marcus, R. C., Li, S. C. and Lai, E.** (1999). Dorsal-ventral patterning defects in the eye of BF-1-deficient mice associated with a restricted loss of shh expression. *Developmental biology* **211**, 53-63.
- Hyer, J., Kuhlman, J., Afif, E. and Mikawa, T.** (2003). Optic cup morphogenesis requires pre-lens ectoderm but not lens differentiation. *Developmental biology* **259**, 351-363.
- Inman, G. J., Nicolas, F. J., Callahan, J. F., Harling, J. D., Gaster, L. M., Reith, A. D., Laping, N. J. and Hill, C. S.** (2002). SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Molecular pharmacology* **62**, 65-74.
- Ivanovitch, K., Cavodeassi, F. and Wilson, S. W.** (2013). Precocious acquisition of neuroepithelial character in the eye field underlies the onset of eye morphogenesis. *Developmental cell* **27**, 293-305.

- Kajita, M., Sugimura, K., Ohoka, A., Burden, J., Suganuma, H., Ikegawa, M., Shimada, T., Kitamura, T., Shindoh, M., Ishikawa, S., et al. (2014). Filamin acts as a key regulator in epithelial defence against transformed cells. *Nature communications* **5**, 4428.
- Karlstrom, R. O., Trowe, T., Klostermann, S., Baier, H., Brand, M., Crawford, A. D., Grunewald, B., Haffter, P., Hoffmann, H., Meyer, S. U., et al. (1996). Zebrafish mutations affecting retinotectal axon pathfinding. *Development* **123**, 427-438.
- Kennedy, B. N., Stearns, G. W., Smyth, V. A., Ramamurthy, V., van Eeden, F., Ankoudinova, I., Raible, D., Hurley, J. B. and Brouckerhoff, S. E. (2004). Zebrafish rx3 and mab21l2 are required during eye morphogenesis. *Developmental biology* **270**, 336-349.
- Kim, N., Min, K. W., Kang, K. H., Lee, E. J., Kim, H. T., Moon, K., Choi, J., Le, D., Lee, S. H. and Kim, J. W. (2014). Regulation of retinal axon growth by secreted Vax1 homeodomain protein. *eLife* **3**, e02671.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. and Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **203**, 253-310.
- Koshiba-Takeuchi, K., Takeuchi, J. K., Matsumoto, K., Momose, T., Uno, K., Hoepker, V., Ogura, K., Takahashi, N., Nakamura, H., Yasuda, K., et al. (2000). Tbx5 and the retinotectum projection. *Science* **287**, 134-137.
- Kwan, K. M., Otsuna, H., Kidokoro, H., Carney, K. R., Saijoh, Y. and Chien, C. B. (2012). A complex choreography of cell movements shapes the vertebrate eye. *Development* **139**, 359-372.
- Lagutin, O. V., Zhu, C. C., Kobayashi, D., Topczewski, J., Shimamura, K., Puelles, L., Russell, H. R., McKinnon, P. J., Solnica-Krezel, L. and Oliver, G. (2003). Six3 repression of Wnt signaling in the anterior neuroectoderm is essential for vertebrate forebrain development. *Genes & development* **17**, 368-379.
- Liu, W. and Cvekl, A. (2017). Six3 in a small population of progenitors at E8.5 is required for neuroretinal specification via regulating cell signaling and survival in mice. *Developmental biology* **428**, 164-175.
- Liu, W., Lagutin, O., Swindell, E., Jamrich, M. and Oliver, G. (2010). Neuroretina specification in mouse embryos requires Six3-mediated suppression of Wnt8b in the anterior neural plate. *The Journal of clinical investigation* **120**, 3568-3577.
- Loosli, F., Staub, W., Finger-Baier, K. C., Ober, E. A., Verkade, H., Wittbrodt, J. and Baier, H. (2003). Loss of eyes in zebrafish caused by mutation of chokh/rx3. *EMBO reports* **4**, 894-899.
- Loosli, F., Winkler, S., Burgdorf, C., Wurmbach, E., Ansorge, W., Henrich, T., Grabher, C., Arendt, D., Carl, M., Krone, A., et al. (2001). Medaka eyeless is the key factor linking retinal determination and eye growth. *Development* **128**, 4035-4044.
- Lupo, G., Harris, W. A. and Lewis, K. E. (2006). Mechanisms of ventral patterning in the vertebrate nervous system. *Nature reviews. Neuroscience* **7**, 103-114.
- Lupo, G., Liu, Y., Qiu, R., Chandraratna, R. A., Barsacchi, G., He, R. Q. and Harris, W. A. (2005). Dorsoventral patterning of the Xenopus eye: a collaboration of Retinoid, Hedgehog and FGF receptor signaling. *Development* **132**, 1737-1748.

- Macdonald, R., Barth, K. A., Xu, Q., Holder, N., Mikkola, I. and Wilson, S. W.** (1995). Midline signalling is required for Pax gene regulation and patterning of the eyes. *Development* **121**, 3267-3278.
- Macdonald, R., Scholes, J., Strahle, U., Brennan, C., Holder, N., Brand, M. and Wilson, S. W.** (1997). The Pax protein Noi is required for commissural axon pathway formation in the rostral forebrain. *Development* **124**, 2397-2408.
- Mangrum, W. I., Dowling, J. E. and Cohen, E. D.** (2002). A morphological classification of ganglion cells in the zebrafish retina. *Visual neuroscience* **19**, 767-779.
- Marti, E. and Bovolenta, P.** (2002). Sonic hedgehog in CNS development: one signal, multiple outputs. *Trends in neurosciences* **25**, 89-96.
- Martinez-Morales, J. R., Del Bene, F., Nica, G., Hammerschmidt, M., Bovolenta, P. and Wittbrodt, J.** (2005). Differentiation of the vertebrate retina is coordinated by an FGF signaling center. *Developmental cell* **8**, 565-574.
- Martinez-Morales, J. R. and Wittbrodt, J.** (2009). Shaping the vertebrate eye. *Current opinion in genetics & development* **19**, 511-517.
- Martynoga, B., Morrison, H., Price, D. J. and Mason, J. O.** (2005). Foxg1 is required for specification of ventral telencephalon and region-specific regulation of dorsal telencephalic precursor proliferation and apoptosis. *Developmental biology* **283**, 113-127.
- Masai, I., Stemple, D. L., Okamoto, H. and Wilson, S. W.** (2000). Midline signals regulate retinal neurogenesis in zebrafish. *Neuron* **27**, 251-263.
- Mathers, P. H., Grinberg, A., Mahon, K. A. and Jamrich, M.** (1997). The Rx homeobox gene is essential for vertebrate eye development. *Nature* **387**, 603-607.
- McLaughlin, T., Torborg, C. L., Feller, M. B. and O'Leary, D. D.** (2003). Retinotopic map refinement requires spontaneous retinal waves during a brief critical period of development. *Neuron* **40**, 1147-1160.
- Medina-Martinez, O., Amaya-Manzanares, F., Liu, C., Mendoza, M., Shah, R., Zhang, L., Behringer, R. R., Mahon, K. A. and Jamrich, M.** (2009). Cell-autonomous requirement for rx function in the mammalian retina and posterior pituitary. *PloS one* **4**, e4513.
- Menuet, A., Alunni, A., Joly, J. S., Jeffery, W. R. and Retaux, S.** (2007). Expanded expression of Sonic Hedgehog in *Astyanax* cavefish: multiple consequences on forebrain development and evolution. *Development* **134**, 845-855.
- Menzel, P., Valencia, F., Godement, P., Dodelet, V. C. and Pasquale, E. B.** (2001). Ephrin-A6, a new ligand for EphA receptors in the developing visual system. *Developmental biology* **230**, 74-88.
- Mohammadi, M., McMahon, G., Sun, L., Tang, C., Hirth, P., Yeh, B. K., Hubbard, S. R. and Schlessinger, J.** (1997). Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors. *Science* **276**, 955-960.
- Monschau, B., Kremoser, C., Ohta, K., Tanaka, H., Kaneko, T., Yamada, T., Handwerker, C., Hornberger, M. R., Loschinger, J., Pasquale, E. B., et al.** (1997). Shared and distinct functions of RAGS and ELF-1 in guiding retinal axons. *The EMBO journal* **16**, 1258-1267.

- Morales, A. V., Espeso-Gil, S., Ocana, I., Nieto-Lopez, F., Calleja, E., Bovolenta, P., Lewandoski, M. and Diez Del Corral, R.** (2016). FGF signaling enhances a sonic hedgehog negative feedback loop at the initiation of spinal cord ventral patterning. *Developmental neurobiology* **76**, 956-971.
- Muller, F., Albert, S., Blader, P., Fischer, N., Hallonet, M. and Strahle, U.** (2000). Direct action of the nodal-related signal cyclops in induction of sonic hedgehog in the ventral midline of the CNS. *Development* **127**, 3889-3897.
- Muller, F., Rohrer, H. and Vogel-Hopker, A.** (2007). Bone morphogenetic proteins specify the retinal pigment epithelium in the chick embryo. *Development* **134**, 3483-3493.
- Nakamoto, M., Cheng, H. J., Friedman, G. C., McLaughlin, T., Hansen, M. J., Yoon, C. H., O'Leary, D. D. and Flanagan, J. G.** (1996). Topographically specific effects of ELF-1 on retinal axon guidance in vitro and retinal axon mapping in vivo. *Cell* **86**, 755-766.
- Nakano, T., Ando, S., Takata, N., Kawada, M., Muguruma, K., Sekiguchi, K., Saito, K., Yonemura, S., Eiraku, M. and Sasai, Y.** (2012). Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. *Cell stem cell* **10**, 771-785.
- Nawrocki, L., BreMiller, R., Streisinger, G. and Kaplan, M.** (1985). Larval and adult visual pigments of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Vision research* **25**, 1569-1576.
- Nikolaou, N., Lowe, A. S., Walker, A. S., Abbas, F., Hunter, P. R., Thompson, I. D. and Meyer, M. P.** (2012). Parametric functional maps of visual inputs to the tectum. *Neuron* **76**, 317-324.
- Nusslein-Volhard, C. and Wieschaus, E.** (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**, 795-801.
- Ohkubo, Y., Chiang, C. and Rubenstein, J. L.** (2002). Coordinate regulation and synergistic actions of BMP4, SHH and FGF8 in the rostral prosencephalon regulate morphogenesis of the telencephalic and optic vesicles. *Neuroscience* **111**, 1-17.
- Ornitz, D. M. and Itoh, N.** (2015). The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology* **4**, 215-266.
- Patten, I. and Placzek, M.** (2000). The role of Sonic hedgehog in neural tube patterning. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **57**, 1695-1708.
- Perron, M., Boy, S., Amato, M. A., Viczian, A., Koebernick, K., Pieler, T. and Harris, W. A.** (2003). A novel function for Hedgehog signalling in retinal pigment epithelium differentiation. *Development* **130**, 1565-1577.
- Peters, M. A.** (2002). Patterning the neural retina. *Current opinion in neurobiology* **12**, 43-48.
- Pfeifferberger, C., Yamada, J. and Feldheim, D. A.** (2006). Ephrin-As and patterned retinal activity act together in the development of topographic maps in the primary visual system. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **26**, 12873-12884.
- Picker, A. and Brand, M.** (2005). Fgf signals from a novel signaling center determine axial patterning of the prospective neural retina. *Development* **132**, 4951-4962.
- Picker, A., Cavodeassi, F., Machate, A., Bernauer, S., Hans, S., Abe, G., Kawakami, K., Wilson, S. W. and Brand, M.** (2009). Dynamic coupling of pattern formation and morphogenesis in the developing vertebrate retina. *PLoS biology* **7**, e1000214.
- Pita, D., Moore, B. A., Tyrrell, L. P. and Fernandez-Juricic, E.** (2015). Vision in two cyprinid fish: implications for collective behavior. *PeerJ* **3**, e11113.

- Poggi, L., Vitorino, M., Masai, I. and Harris, W. A.** (2005). Influences on neural lineage and mode of division in the zebrafish retina in vivo. *The Journal of cell biology* **171**, 991-999.
- Pottin, K., Hinaux, H. and Retaux, S.** (2011). Restoring eye size in *Astyanax mexicanus* blind cavefish embryos through modulation of the Shh and Fgf8 forebrain organising centres. *Development* **138**, 2467-2476.
- Raper, J. A. and Grunewald, E. B.** (1990). Temporal retinal growth cones collapse on contact with nasal retinal axons. *Experimental neurology* **109**, 70-74.
- Rebagliati, M. R., Toyama, R., Haffter, P. and Dawid, I. B.** (1998). cyclops encodes a nodal-related factor involved in midline signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 9932-9937.
- Reber, M., Burrola, P. and Lemke, G.** (2004). A relative signalling model for the formation of a topographic neural map. *Nature* **431**, 847-853.
- Reifers, F., Adams, J., Mason, I. J., Schulte-Merker, S. and Brand, M.** (2000). Overlapping and distinct functions provided by fgf17, a new zebrafish member of the Fgf8/17/18 subgroup of Fgfs. *Mechanisms of development* **99**, 39-49.
- Reifers, F., Bohli, H., Walsh, E. C., Crossley, P. H., Stainier, D. Y. and Brand, M.** (1998). Fgf8 is mutated in zebrafish acerebellar (ace) mutants and is required for maintenance of midbrain-hindbrain boundary development and somitogenesis. *Development* **125**, 2381-2395.
- Rembold, M., Lahiri, K., Foulkes, N. S. and Wittbrodt, J.** (2006). Transgenesis in fish: efficient selection of transgenic fish by co-injection with a fluorescent reporter construct. *Nature protocols* **1**, 1133-1139.
- Robinson, J., Schmitt, E. A., Harosi, F. I., Reece, R. J. and Dowling, J. E.** (1993). Zebrafish ultraviolet visual pigment: absorption spectrum, sequence, and localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 6009-6012.
- Rohr, K. B., Barth, K. A., Varga, Z. M. and Wilson, S. W.** (2001). The nodal pathway acts upstream of hedgehog signaling to specify ventral telencephalic identity. *Neuron* **29**, 341-351.
- Sampath, K., Rubinstein, A. L., Cheng, A. M., Liang, J. O., Fekany, K., Solnica-Krezel, L., Korzh, V., Halpern, M. E. and Wright, C. V.** (1998). Induction of the zebrafish ventral brain and floorplate requires cyclops/nodal signalling. *Nature* **395**, 185-189.
- Sanchez-Arrones, L., Nieto-Lopez, F., Sanchez-Camacho, C., Carreres, M. I., Herrera, E., Okada, A. and Bovolenta, P.** (2013). Shh/Boc signaling is required for sustained generation of ipsilateral projecting ganglion cells in the mouse retina. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **33**, 8596-8607.
- Sanchez-Camacho, C. and Bovolenta, P.** (2008). Autonomous and non-autonomous Shh signalling mediate the in vivo growth and guidance of mouse retinal ganglion cell axons. *Development* **135**, 3531-3541.
- Sasai, N., Kutejova, E. and Briscoe, J.** (2014). Integration of signals along orthogonal axes of the vertebrate neural tube controls progenitor competence and increases cell diversity. *PLoS biology* **12**, e1001907.
- Scherz, P. J., Harfe, B. D., McMahon, A. P. and Tabin, C. J.** (2004). The limb bud Shh-Fgf feedback loop is terminated by expansion of former ZPA cells. *Science* **305**, 396-399.

- Schier, A. F., Neuhauss, S. C., Harvey, M., Malicki, J., Solnica-Krezel, L., Stainier, D. Y., Zwartkruis, F., Abdelilah, S., Stemple, D. L., Rangini, Z., et al. (1996). Mutations affecting the development of the embryonic zebrafish brain. *Development* **123**, 165-178.
- Schmitt, E. A. and Dowling, J. E. (1996). Comparison of topographical patterns of ganglion and photoreceptor cell differentiation in the retina of the zebrafish, *Danio rerio*. *The Journal of comparative neurology* **371**, 222-234.
- Schulte, D. and Bumsted-O'Brien, K. M. (2008). Molecular mechanisms of vertebrate retina development: implications for ganglion cell and photoreceptor patterning. *Brain research* **1192**, 151-164.
- Schulte, D., Furukawa, T., Peters, M. A., Kozak, C. A. and Cepko, C. L. (1999). Misexpression of the Emx-related homeobox genes cVax and mVax2 ventralizes the retina and perturbs the retinotectal map. *Neuron* **24**, 541-553.
- Shanmugalingam, S., Houart, C., Picker, A., Reifers, F., Macdonald, R., Barth, A., Griffin, K., Brand, M. and Wilson, S. W. (2000). *Ace/Fgf8* is required for forebrain commissure formation and patterning of the telencephalon. *Development* **127**, 2549-2561.
- Shinya, M., Koshida, S., Sawada, A., Kuroiwa, A. and Takeda, H. (2001). Fgf signalling through MAPK cascade is required for development of the subpallial telencephalon in zebrafish embryos. *Development* **128**, 4153-4164.
- Simpson, H. D., Mortimer, D. and Goodhill, G. J. (2009). Theoretical models of neural circuit development. *Current topics in developmental biology* **87**, 1-51.
- Simpson, J. I. (1984). The accessory optic system. *Annual review of neuroscience* **7**, 13-41.
- Smith, A. N., Miller, L. A., Radice, G., Ashery-Padan, R. and Lang, R. A. (2009). Stage-dependent modes of Pax6-Sox2 epistasis regulate lens development and eye morphogenesis. *Development* **136**, 2977-2985.
- Steinfeld, J., Steinfeld, I., Coronato, N., Hampel, M. L., Layer, P. G., Araki, M. and Vogel-Hopker, A. (2013). RPE specification in the chick is mediated by surface ectoderm-derived BMP and Wnt signalling. *Development* **140**, 4959-4969.
- Stigloher, C., Ninkovic, J., Laplante, M., Geling, A., Tannhauser, B., Topp, S., Kikuta, H., Becker, T. S., Houart, C. and Bally-Cuif, L. (2006). Segregation of telencephalic and eye-field identities inside the zebrafish forebrain territory is controlled by Rx3. *Development* **133**, 2925-2935.
- Storm, E. E., Garel, S., Borello, U., Hebert, J. M., Martinez, S., McConnell, S. K., Martin, G. R. and Rubenstein, J. L. (2006). Dose-dependent functions of Fgf8 in regulating telencephalic patterning centers. *Development* **133**, 1831-1844.
- Stuermer, C. A. (1988). Retinotopic organization of the developing retinotectal projection in the zebrafish embryo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **8**, 4513-4530.
- Suetterlin, P., Marler, K. M. and Drescher, U. (2012). Axonal ephrinA/EphA interactions, and the emergence of order in topographic projections. *Seminars in cell & developmental biology* **23**, 1-6.
- Takahashi, H., Sakuta, H., Shintani, T. and Noda, M. (2009). Functional mode of FoxD1/CBF2 for the establishment of temporal retinal specificity in the developing chick retina. *Developmental biology* **331**, 300-310.

- Takahashi, H., Shintani, T., Sakuta, H. and Noda, M.** (2003). CBF1 controls the retinotectal topographical map along the anteroposterior axis through multiple mechanisms. *Development* **130**, 5203-5215.
- Take-uchi, M., Clarke, J. D. and Wilson, S. W.** (2003). Hedgehog signalling maintains the optic stalk-retinal interface through the regulation of Vax gene activity. *Development* **130**, 955-968.
- Tao, W. and Lai, E.** (1992). Telencephalon-restricted expression of BF-1, a new member of the HNF-3/fork head gene family, in the developing rat brain. *Neuron* **8**, 957-966.
- Vaney, D. I., Sivyer, B. and Taylor, W. R.** (2012). Direction selectivity in the retina: symmetry and asymmetry in structure and function. *Nature reviews. Neuroscience* **13**, 194-208.
- Varga, Z. M., Amores, A., Lewis, K. E., Yan, Y. L., Postlethwait, J. H., Eisen, J. S. and Westerfield, M.** (2001). Zebrafish smoothened functions in ventral neural tube specification and axon tract formation. *Development* **128**, 3497-3509.
- Viktorin, G., Chiuchitu, C., Rissler, M., Varga, Z. M. and Westerfield, M.** (2009). Emx3 is required for the differentiation of dorsal telencephalic neurons. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **238**, 1984-1998.
- Vokes, S. A., Ji, H., McCuine, S., Tenzen, T., Giles, S., Zhong, S., Longabaugh, W. J., Davidson, E. H., Wong, W. H. and McMahon, A. P.** (2007). Genomic characterization of Gli-activator targets in sonic hedgehog-mediated neural patterning. *Development* **134**, 1977-1989.
- Walshe, J. and Mason, I.** (2003). Unique and combinatorial functions of Fgf3 and Fgf8 during zebrafish forebrain development. *Development* **130**, 4337-4349.
- Walter, J., Kern-Veits, B., Huf, J., Stolze, B. and Bonhoeffer, F.** (1987). Recognition of position-specific properties of tectal cell membranes by retinal axons in vitro. *Development* **101**, 685-696.
- Weiss, O., Kaufman, R., Michaeli, N. and Inbal, A.** (2012). Abnormal vasculature interferes with optic fissure closure in lmo2 mutant zebrafish embryos. *Developmental biology* **369**, 191-198.
- Westerfield, M.** (1993). The Zebrafish Book: a guide for the laboratory use of the zebrafish (*Brachydanio rerio*).
- Wilson, S. W. and Houart, C.** (2004). Early steps in the development of the forebrain. *Developmental cell* **6**, 167-181.
- Yamagata, M., Mai, A., Pollerberg, G. E. and Noda, M.** (1999). Regulatory interrelations among topographic molecules CBF1, CBF2 and EphA3 in the developing chick retina. *Development, growth & differentiation* **41**, 575-587.
- Yamaguchi, T. P.** (2001). Heads or tails: Wnts and anterior-posterior patterning. *Current biology : CB* **11**, R713-724.
- Yin, J., Morrissey, M. E., Shine, L., Kennedy, C., Higgins, D. G. and Kennedy, B. N.** (2014). Genes and signaling networks regulated during zebrafish optic vesicle morphogenesis. *BMC genomics* **15**, 825.
- Yun, S., Saijoh, Y., Hirokawa, K. E., Kopinke, D., Murtaugh, L. C., Monuki, E. S. and Levine, E. M.** (2009). Lhx2 links the intrinsic and extrinsic factors that control optic cup formation. *Development* **136**, 3895-3906.
- Zhang, L., Mathers, P. H. and Jamrich, M.** (2000). Function of Rx, but not Pax6, is essential for the formation of retinal progenitor cells in mice. *Genesis* **28**, 135-142.

Zimmermann, F. F., Gaspary, K. V., Siebel, A. M., Leite, C. E., Kist, L. W., Bogo, M. R. and Bonan, C. D. (2017). Analysis of Extracellular Nucleotide Metabolism in Adult Zebrafish After Embryological Exposure to Valproic Acid. *Molecular neurobiology* **54**, 3542-3553.

Zou, C. and Levine, E. M. (2012). Vsx2 controls eye organogenesis and retinal progenitor identity via homeodomain and non-homeodomain residues required for high affinity DNA binding. *PLoS genetics* **8**, e1002924.

Zuber, M. E., Gestri, G., Viczian, A. S., Barsacchi, G. and Harris, W. A. (2003). Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors. *Development* **130**, 5155-5167.

Zuniga, A., Haramis, A. P., McMahon, A. P. and Zeller, R. (1999). Signal relay by BMP antagonism controls the SHH/FGF4 feedback loop in vertebrate limb buds. *Nature* **401**, 598-602.